

ANNALES  
DE  
L'INSTITUT PASTEUR

ALEXANDRE BESREDKA

(1870-1940)

Notre collègue Besredka, qui souffrait depuis plusieurs mois d'une douloureuse maladie, a succombé le 28 février 1940. Sa mort laisse un grand vide parmi nous.

Alexandre Besredka est né le 29 mars 1870 à Odessa. Après d'excellentes études secondaires, il s'inscrit à la Faculté des Sciences de sa ville natale où enseignait Elie Metchnikoff qui devait devenir son maître à l'Institut Pasteur.

En 1893, il vient à Paris et, en 1897, il y reçoit le diplôme de docteur en médecine. La même année il est nommé préparateur à l'Institut Pasteur dans le service de Metchnikoff.

La bataille pour la doctrine phagocytaire touchait à sa fin. Il devenait évident aux yeux de tous que « dans l'immunité naturelle, l'activité phagocytaire occupe le devant de la scène » (J. Bordet). Cependant la découverte des toxines microbiennes apportait une notion nouvelle d'une importance considérable dans la pathogénie des infections microbiennes, et la question se posait de savoir si « les phagocytes qui assurent l'immunité naturelle contre les microbes sont capables d'agir de même

vis-à-vis des produits toxiques et, en particulier, vis-à-vis de ceux qui émanent des microbes ».

Les premières recherches de Besredka sur ce sujet ont trait à la toxicité des bacilles typhiques tués. Il constate que, comme dans l'infection produite par les bacilles vivants, il suffit de renforcer la défense phagocytaire du péritoine en provoquant une leucocytose artificielle pour que les animaux supportent une dose des mêmes germes tués sûrement mortelle pour les témoins.

Après avoir mis en évidence la même aptitude des leucocytes à lutter contre les poisons minéraux tels que le trisulfure d'arsenic, Besredka porte son attention sur les méthodes d'immunisation contre divers germes pathogènes : bacille typhique, bacille de la peste, bacilles dysentériques, streptocoques, et il poursuit ses investigations sur les propriétés des endotoxines typhique, pesteuse et dysentérique.

Nous sommes en 1907, en plein essor de la sérothérapie. La découverte, encore récente, de l'anaphylaxie venait de mettre en lumière les inconvénients et, parfois, les dangers de l'administration parentérale de substances protéiques, en particulier de sérum sanguin provenant d'une espèce étrangère. « Impressionné par la gravité des accidents anaphylactiques — dit Besredka — nous n'eûmes qu'un seul objectif dès le début, c'était de chercher à vacciner l'animal contre ces accidents ».

Quelle est donc la cause des troubles observés dans cette circonstance ? Supposant qu'une première injection de protéine sérique (injection préparante ou sensibilisante) détermine une lésion latente du système nerveux central, Besredka décide d'injecter la dose déchaînante non dans la cavité péritonéale, comme on le faisait habituellement, mais dans le cerveau où il lui semblait que devait s'exercer l'action毒ique du sérum. L'expérience a prouvé que si l'injection déchaînante par voie péritonéale donne une mortalité de 25 p. 100 environ, l'injection intracérébrale tue régulièrement tous les animaux préparés, même quand la dose administrée est vingt fois plus faible.

Instruit par ces faits, Besredka aborde la « vaccination » antianaphylactique. Il constate que le « choc anaphylactique »

— l'expression est de lui — peut être évité si, avant l'injection d'épreuve dans le cerveau, l'animal reçoit dans le péritoine une dose de sérum par elle-même inoffensive. L'« immunité » anti-anaphylactique s'établit avec une rapidité extraordinaire : quelques minutes après l'injection « désensibilisante », le cobaye supporte impunément l'injection intracérébrale d'une quantité de sérum sûrement mortelle pour les témoins non « désensibilisés ».

Ces recherches conduisirent notre collègue à préconiser, pour la prévention des accidents anaphylactiques, le procédé des injections subintronantes qui consiste à faire précédé l'injection de sérum de plusieurs injections de doses progressive-ment croissantes du même produit, à quelques minutes d'in-tervalle. La réalisation de l'antianaphylaxie est une des plus belles acquisitions pratiques que la médecine doit à Besredka.

L'œuvre de Besredka sera désormais dominée par cette notion de la « désensibilisation ». « Lorsque, pour expliquer l'antianaphylaxie — écrira-t-il vingt-cinq ans plus tard — nous fûmes amené à introduire en microbiologie la notion de « désensi-bilisation », nous étions loin de penser que cette explication pourrait être applicable à l'immunité antimicrobienne. Or, à la lumière de cette nouvelle notion, la chose devient plausible. Quand nous inoculons au cobaye des microbes pathogènes, l'affinité de ces derniers pour la peau ou pour l'intestin est telle qu'il s'ensuit une sorte de choc se traduisant par une lésion plus ou moins grave ou mortelle. Mais lorsque par suite d'un apport préalable soit de vaccin, soit d'antivirus, soit de virus sensibilisé, la réceptivité de la peau ou de l'intestin est émoussée, le choc se trouve amorti : on a beau inoculer des virus vivants et virulents, les organes réceptifs, une fois désen-sibilisés, ne réagissent plus. »

A partir de 1911, Besredka participe aux recherches de Metchnikoff sur la fièvre typhoïde expérimentale du chim-panzé. Metchnikoff avait reproduit chez cet anthropoïde une infection typique en administrant le bacille d'Eberth par voie buccale. Les deux savants s'assurent que les bacilles typhiques tués sont incapables de protéger le chimpanzé contre l'infection expérimentale. L'inoculation sous-cutanée de bacilles typhiques vivants confère bien une immunité

solide, mais elle détermine des réactions extrêmement violentes. Pour remédier à ce grave inconvénient, Besredka eut l'idée de « sensibiliser » les bacilles typhiques en leur faisant absorber les anticorps du sérum antityphique. L'immunité anti-typhoïdique qu'engendrent les germes ainsi traités s'installe alors sans réaction appréciable.

Des « vaccins sensibilisés », selon la méthode de Besredka, furent par la suite employés dans diverses infections (rage, A. Marie ; dysenterie, Dopter ; tuberculose, Calmette et Guérin ; clavelée, Bridré et Boquet).

En 1913, Besredka oriente ses études vers la culture du bacille de Koch et le séro-diagnostic de la tuberculose. Il donne la formule d'un nouveau milieu à l'oeuf, qui permet d'obtenir en quelques jours un antigène excellent pour la recherche des anticorps tuberculeux. La guerre interrompt ses travaux.

Mobilisé le 2 août 1914 comme infirmier, il est bientôt nommé médecin aide-major et chargé du laboratoire de bactériologie de la place de Verdun (1914-1915). L'hôpital qui abrite son laboratoire et ce laboratoire même sont atteints par le bombardement ennemi. En 1915, il prend la direction du laboratoire de Bar-le-Duc qu'il occupe jusqu'en 1918.

A son retour à l'Institut Pasteur, il recueille la succession de son maître Metchnikoff décédé en 1916. Dès 1918, il porte son attention sur les infections intestinales. Inoculant des bacilles dysentériques dans la veine à des lapins, il constate que ces microbes se retrouvent dans l'intestin mais non dans les autres organes. A l'exemple des faits déjà établis par Sanarelli pour le vibrion cholérique, les bacilles dysentériques paraissent ainsi doués d'une affinité particulière pour l'intestin. C'est donc sur cet organe même qu'il convient de faire porter l'action immunisante spécifique : à l'entéro-infection il faut opposer l'entéro-vaccination.

Besredka réussit, en effet, à vacciner des animaux de laboratoire contre la dysenterie en leur faisant ingérer des bacilles dysentériques tués. L'immunité qui en résulte ne serait pas liée à la production d'anticorps ; mais les cellules réceptives de l'intestin « désensibilisées » par le vaccin interviendraient en constituant une barrière « infranchissable pour les bacilles ». Il s'agirait d'une « immunité intestinale locale ». Il en serait

de même dans d'autres infections intestinales : fièvres typhoïde et paratyphoïde, colibacillose, choléra. La voie de choix dans la vaccination contre les infections intestinales est la voie buccale. Toutefois, au contraire de ce qui se passe pour la dysenterie, la simple ingestion de germes tués ne confère pas l'immunité aux animaux de laboratoire (lapin). Il faut au préalable décapter la muqueuse intestinale au moyen de bile de bœuf pour qu'elle devienne accessible à l'action du vaccin.

L'intestin n'est d'ailleurs pas le seul organe qui fournit des exemples d'infection et d'immunité locales ; la même affinité, parfois exclusive, existe aussi pour la peau. L'infection cutanée locale est justiciable de la vaccination cutanée : la cuti-vaccination crée la cuti-immunité.

En étudiant le charbon expérimental du cobaye, Besredka fut amené à conclure que « loin d'être une septicémie, le charbon est une maladie essentiellement locale, cutanée, du moins pendant une grande partie de son évolution ». Il suffit d'inoculer un très petit nombre de bactéries dans la peau pour provoquer une infection mortelle, alors qu'on peut en introduire impunément des quantités énormes dans la cavité péritonéale par exemple. Besredka en conclut que la peau est le seul organe sensible au charbon. C'est elle seule qu'il faut immuniser pour rendre réfractaire l'organisme entier. Ces recherches de Besredka sur le charbon l'ont conduit à préconiser la vaccination par voie intradermique qui est entrée dans la pratique.

D'autres bactéries pathogènes, dont les staphylocoques et les streptocoques, se distinguent également par une affinité élective pour la peau. En ce qui les concerne, la vaccination peut être réalisée chez les animaux de laboratoire par l'injection intradermique de suspensions bactériennes ou même par l'application, sur la peau rasée, de filtrats de cultures en bouillon des germes correspondants (antivirus).

Ces dernières années, Besredka s'est particulièrement consacré à l'étude des tumeurs malignes. Au lieu de « l'idée de greffe généralement adoptée à l'heure actuelle » pour les tumeurs malignes expérimentales, il admit « à titre d'hypothèse de travail » que la tumeur produit « une réaction de défense de l'organisme vis-à-vis d'un virus répandu dans la

nature, comme l'est le staphylocoque par exemple, mais beaucoup plus fragile que ce dernier ». Et pour en fournir la preuve, il institue toute une série d'expériences très ingénieuses.

Au cours des recherches qu'il a poursuivies avec la collaboration de Gross sur un sarcome de la souris et sur l'épithélioma de Brown-Pearce du lapin, Besredka insiste sur la régularité avec laquelle se résorbent les tumeurs intracutanées. La résorption d'une tumeur entraîne l'immunité de l'organisme vis-à-vis d'une nouvelle inoculation de cette tumeur ; or, cette résorption, très rare pour les tumeurs intratesticulaires, plus fréquente mais irrégulière et imprévisible pour les tumeurs sous-cutanées, devient la règle pour les tumeurs inoculées *dans la peau*. Par conséquent, la technique de l'inoculation intracutanée constitue une méthode de choix pour l'étude de l'immunité contre les tumeurs de greffe.

Dans le laboratoire où Besredka a brillamment maintenu les nobles traditions de son Maître, des travailleurs du monde entier n'ont cessé d'affluer pour s'instruire. Notre regretté collègue les accueillait avec une amérité parfaite et s'efforçait par son exemple de leur communiquer sa passion pour la recherche, sa foi dans le progrès indéfini des sciences biologiques.

Il exprimait ses idées et exposait le fruit de ses travaux dans une langue imagée, alerte, très vivante, avec un charme qui décourageait d'avance toute contradiction.

Sans doute quelques-unes des hypothèses qu'il a émises prêtent-elles à discussion. Peu importe, puisqu'elles ont eu le mérite de stimuler un grand nombre de chercheurs et d'agrandir nos connaissances dans maints domaines mal explorés de la pathologie.

Le nom de Besredka restera intimement lié à celui de Metchnikoff. L'Institut Pasteur entretiendra fidèlement le culte de sa mémoire en reconnaissance de l'œuvre scientifique qu'il a accomplie pendant près d'un demi-siècle et du lustre qu'il a ajouté à notre Maison.

# ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DES TOXINES DU *B. PERFRINGENS* TYPES A ET C AU MOYEN DE L'ULTRAFILTRATION FRACTIONNÉE

par PIERRE GRABAR, SERGE LEVENSON et S. STANLEY SCHNEIERSON.

(*Institut Pasteur, Laboratoire de M. P. GRABAR  
et Service de M. M. WEINBERG.*)

On sait que la toxine du *B. perfringens* contient non pas une seule, mais plusieurs substances biologiquement actives et que, d'autre part, les toxines des différents types (A, B, C, D) de cette espèce bactérienne ont une structure antigénique différente (Mc Gaughey [12], Glenny, Barr, Llewellyn-Jones, Dalling et Ross [5], Wilsdon [22], Bortwick [1], etc.). Pour Weinberg et Guillaumie [18] le *B. perfringens* est « l'anaérobiose à la fois le plus répandu dans la nature et le plus complexe quant à sa constitution antigénique ».

S'agit-il de substances réellement différentes et séparables ou bien seulement de différentes activités de la même substance qui est tantôt hémolytique, tantôt non hémolytique mais toxique, tantôt neurotoxique (Weinberg et Seguin [21], Weinberg et Barotte [16]), tantôt myotoxique (Henry [10]), tantôt nécrosante (Weinberg et Combiesco [17]), tantôt leucoagglutinante (Weinberg et Kepinoff [19]), etc.?

On s'est servi de procédés différents afin d'élucider ce problème. Weinberg et Nasta [20] ont démontré l'importance du facteur hémolytique de la toxine du *B. perfringens*, type A. Ils absorbent l'hémolysine par des globules de mouton et constatent que le liquide débarrassé de ce facteur n'est plus que faiblement toxique pour le cobaye.

Weinberg et Guillaumie [18] ont constaté que le pouvoir hémolytique de la toxine du *B. perfringens* est moins thermorésistant que son pouvoir toxique. Ainsi, après trente minutes de chauffage à 100° les toxines des types B et C n'ont plus de pouvoir hémolytique, tandis que leur pouvoir toxique est diminué mais non aboli même après une heure de chauffage à cette température.

Prigge [13] n'a pas pu changer le rapport entre le facteur  $\alpha$  (facteur hémolytique) et le facteur zeta (facteur toxique non hémolytique) du

*B. perfringens* type A en modifiant la composition du milieu de culture, surtout en ce qui concerne la nature de la peptone employée. Par contre, en procédant à des précipitations fractionnées (d'abord avec du  $\text{SO}_4\text{Na}_2$ , ensuite avec du  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ) cet auteur a pu séparer, du moins partiellement, la toxine zeta de la toxine  $\alpha$ . Le degré de cette purification n'était pas constant, mais dans bien des cas il s'agissait d'une élimination considérable du facteur  $\alpha$ . Ainsi, dans environ la moitié des cas, le rapport des doses minima hémolytiques correspondant à une dose minima mortelle était diminué de 50 à 100 fois.

Contrairement à Prigge, les auteurs américains Stewart et Clampit [15] ont pu diminuer ou même supprimer la production de la toxine  $\alpha$  du *B. perfringens* type A, en modifiant la composition du milieu de culture. Ils se sont, en outre, servis du procédé d'ultrafiltration fractionnée pour la séparation du facteur hémolytique du facteur non hémolytique de la toxine du *B. perfringens*, types A et C : la séparation aurait pu « être effectuée sur les filtrats du type C et également, quoique de façon moins manifeste, sur des filtrats du type A ».

Dans nos recherches personnelles (Schneierson et Grabar [14], Levenson et Grabar [14]), nous nous sommes servis également de l'ultrafiltration fractionnée. Il nous a semblé intéressant de vérifier, de compléter et de préciser les résultats obtenus par Stewart et Clampit.

### TECHNIQUES.

Dans toutes nos expériences nous avons employé comme milieu de culture le bouillon Vf (Weinberg et Goy) préparé par la digestion pepsique d'un mélange de viande de bœuf et de foie de bœuf dans la proportion de 4 : 1, glucosé à 1 p. 1.000 et ajusté au pH = 7,7-7,8. Le bouillon largementensemencé (comme semence, nous avons toujours employé une culture âgée de vingt-quatre heures environ) était placé à l'étuve à 37°. Après une incubation de vingt-trois heures, nous procédions à la centrifugation. Le liquide surnageant (bouillon toxique) était ensuite décanté. Une partie de nos expériences avec la toxine du type A a été effectuée avec ce bouillon toxique filtré sur bougie Chamberland. Dans d'autres expériences avec la toxine du type A et dans toutes nos expériences avec la toxine du type C, nous avons employé des « toxines concentrées ». Pour préparer ces « toxines concentrées », le bouillon toxique a été précipité par du  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  à saturation (soit 700 grammes de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  par litre de bouillon). Afin de recueillir toute la toxine précipitée nous avons d'abord recueilli la fraction qui monte à la surface du liquide ; ce dernier a été ensuite filtré sur du papier filtre, après avoir été débarrassé des cristaux de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  en excès (au moyen d'une spatule). Par suite du colmatage du papier-filtre, la filtration est assez lente et dure plusieurs heures. Pour éviter une inactivation de la toxine par suite de manipulations trop prolongées, nous avons, dans les expériences avec la toxine du type A, percé, vers la fin de la filtration, un petit trou dans le papier-filtre pour hâter l'écoulement du liquide. Avec la toxine du type C nous avons préféré attendre que la filtration soit complète. La récupération de la toxine précipitée a été, dans ce dernier cas, plus complète, mais par contre, la « toxine concentrée » obtenue contenait des quantités plus impor-

tantes de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ . La précipitation et la filtration ont été faites autant que possible à une lumière réduite. La filtration terminée, le précipité (celui recueilli à la surface du bouillon et celui se trouvant sur le filtre) a été dissous dans une quantité de solution physiologique représentant environ 1/10 du volume initial du bouillon (1). Afin de dissoudre tout le précipité, nous avons broyé à plusieurs reprises le papier-filtre dans de la solution physiologique avec un gros agitateur. Nous avons ensuite décanté et centrifugé ce liquide contenant des débris de papier-filtre. Le liquide transparent obtenu après la centrifugation représentait notre « toxine concentrée ».

Tous nos échantillons de toxine ont d'abord été filtrés à travers des membranes de 2 R (diamètre moyen des pores) = 1760  $\mu$ , afin de les débarrasser de suspensions grossières, puis sur des membranes de 2 R = 460 à 500  $\mu$ . (2). A partir de ce dernier filtrat, que nous appelons ici « solution initiale », nous avons effectué les filtrations sur des membranes de diverses porosités. La quantité de « solution initiale » employée pour les filtrations était suivant les cas de 5 à 10 cent. cubes pour chaque membrane. Lorsqu'il ne restait plus de liquide, le résidu resté sur la membrane était repris par de la solution physiologique ou, dans quelques expériences avec la toxine du type A, par du bouillon stérile, en utilisant un volume égal à celui du liquide employé pour la filtration. Dans la plupart des expériences avec la toxine du type C, ce résidu a été préalablement lavé (par filtration) avec de la solution physiologique.

La durée de la filtration étant très différente suivant la porosité des membranes (de quelques minutes jusqu'à un ou deux jours ; dans le cas de la membrane de 2 R = 5,9  $\mu$ , nous avons arrêté la filtration qui n'était pas encore terminée après sept jours), nous avons toujours gardé tous nos liquides l'un à côté de l'autre pendant toute la durée des filtrations (à l'abri de la lumière). Les filtrations terminées, tous nos filtrats et les solutions des résidus ont été gardés à la glacière. Durant les titrages, toutes les solutions se trouvaient toujours l'une à côté de l'autre. En d'autres termes, toutes les solutions étaient toujours maintenues dans les mêmes conditions de lumière et de température afin d'obtenir des résultats comparables.

Les titrages du pouvoir hémolytique ont été faits d'après la technique employée par Weinberg et Guillaumie [18], en recherchant la dose minima hémolytique pour 0 c. c. 1 d'une dilution à 5 p. 100 de globules de mouton. Nos titres hémolytiques indiquent le nombre de doses minima hémolytiques contenues dans 1 cent. cube de liquide.

Tous les titrages du pouvoir toxique ont été effectués sur des souris, dans la plupart des cas par injections intraveineuses. Ce n'est que dans quelques expériences avec la toxine du type A que nous avons été amenés à faire des titrages par injections intrapéritonéales, la toxicité des solutions étant trop faible pour tuer la souris à la dose de 0 c. c. 5.

(1) Remarquons cependant que malgré la concentration apparente de la toxine, son titre toxique et hémolytique n'a pas été augmenté dans la même proportion. Mais le titre des solutions de « toxine concentrée » se maintenait plus longtemps au même niveau.

(2) Nous avons pu nous rendre compte que ces filtrations préliminaires n'occasionnent pas de pertes appréciables de toxines.

Pour l'ultrafiltration nous avons employé des membranes « Gradelcol », des appareils en verre de Grabar et une pression positive d'azote, différente suivant le 2R des membranes. On trouvera les détails techniques dans des publications antérieures [2, 6, 7].

### RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

**1° Toxine du *B. perfringens*, type A (SOUCHE LECHIEN).** — Comme nous l'avons déjà indiqué plus haut, nous nous sommes servis, pour nos expériences sur la toxine du type A, aussi bien de bouillons toxiques non concentrés que de « toxines concentrées ». Nous avons réuni dans le tableau I les résultats obtenus avec des bouillons toxiques non concentrés, tandis que le tableau II résume nos résultats avec des « toxines concentrées ».

TABLEAU I. — Toxine du *B. perfringens* type A (bouillon toxique).

MEMBRANE (2R en m $\mu$ )	TITRE HÉMOLYTIQUE		
	de la solution initiale	du filtrat	du résidu
1400 . . . . .	35	20	—
520 . . . . .	120	120	0
340 . . . . .	100	0	0
225 . . . . .	120	0	0
200 . . . . .	35	Traces.	0
158 . . . . .	100	0	—
58 . . . . .	100	0	0
55 . . . . .	35	0	0
40 . . . . .	35	0	0
32 . . . . .	35	0	0
23 . . . . .	35	0	9
	120-140	0	35-70

On voit que l'hémolysine des échantillons de toxine non concentrée est déjà entièrement retenue par des membranes ayant un diamètre moyen des pores (2R) relativement grand. En effet, comme le montre le tableau I, l'hémolysine traverse facilement les membranes de 2R = 520 m $\mu$ , mais, à partir des membranes de 2R = 340 m $\mu$ , les filtrats ne manifestent plus aucune activité hémolytique. Les résidus restés sur les membranes après la filtration et repris avec du bouillon ou

TABLEAU II. — Toxine concentrée du *B. perfringens* type A.

MEMBRANE (2 R en m <sup>2</sup> )	de la solution initiale	TITRE HÉMOLYTIQUE		DOSE TUANT LA SOURIS EN 24 HEURES	
		du filtrat	du résidu	Filtrat	Résidu
1410	• • •	350	—	Inférieure à 1/40 de c.c. (i. v.). 1/30 de c.c. (i. p.). Inférieure à 1/40 de c.c. (i. v.).	—
1410	• • •	35	—	—	—
1410	• • •	35	—	—	—
1410	• • •	35	—	—	—
1410	• • •	350	—	—	—
1100	• • •	20	0	1/40 de c.c. (i. v.).	—
1100	• • •	35	—	1/20 de c.c. (i. v.).	—
700	• • •	20	—	—	—
590	• • •	20	12	—	—
530	• • •	350	200	—	—
487	• • •	35	0	1/40 de c.c. (i. v.). 1/20 de c.c. (i. v.).	—
362	• • •	20	12	—	—
260	• • •	35	0	—	—
224	• • •	350	120	—	—
200	• • •	20	0	—	—
166	• • •	350	140	—	—
132	• • •	350	120	—	—
95	• • •	35	0	—	—
55	• • •	350	200	—	—
51	• • •	35	0	Traces. Survit à 1/20 de c.c. (i. v.).	—
32	• • •	350	0	Survit à 1/20 de c.c. (i. v.). 1/10 de c.c. (i. v.).	—
23	• • •	35	0	Traces. Survit à 1/2 c.c. (i. p.).	—
23	• • •	35	0	40	1/2 c.c. (i. p.). Survit à 1/20 de c.c. (i. v.).
23	• • •	35	Traces.	—	—
20	• • •	350	350	Survit à 1/20 de c.c. (i. v.). Survit à 1/2 c.c. (i. p.).	—
20	• • •	35	0	1/30 de c.c. (i. p.).	—

Abbreviations : i. v., injections intraveineuses ; i. p., injections intrapéritonéales ; —, n'a pas été fait.

de la solution physiologique, ne contiennent pas, non plus, d'hémolysine. Celle-ci est donc entièrement adsorbée par la membrane ultra-filtrante. Ce n'est que dans les résidus obtenus avec des membranes de  $2R = 23 \text{ m}\mu$  que nous retrouvons de l'hémolysine.

L'appauvrissement des filtrats en hémolysine par suite de l'adsorption est moins manifeste lorsqu'on s'adresse à des solutions plus riches en hémolysine, comme c'est le cas avec nos « toxines concentrées » (3). Ainsi, par exemple, nous avons obtenu un filtrat fortement hémolytique même avec une membrane de  $2R = 55 \text{ m}\mu$  (tableau II). A partir de la membrane de  $2R = 51 \text{ m}\mu$ , les filtrats ne manifestent plus d'activité hémolytique (dans 2 cas, il y avait des traces d'hémolysine). Cependant, tandis que le résidu resté sur la membrane de  $2R = 51 \text{ m}\mu$  ne contenait que des traces d'hémolysine, le résidu resté sur la membrane de  $2R = 32 \text{ m}\mu$  était nettement hémolytique, mais son titre était de beaucoup inférieur à celui de la solution initiale. Par contre, dans deux expériences (sur quatre) avec des membranes de  $2R = 23 \text{ m}\mu$  et dans l'expérience avec une membrane de  $2R = 20 \text{ m}\mu$ , nous avons pu récupérer dans le résidu la totalité de l'hémolysine.

Quelques expériences effectuées avec des échantillons de toxine non concentrée nous ont montré que les filtrats hémolytiques (membranes de  $2R = 1.400 \text{ m}\mu$  et  $520 \text{ m}\mu$ ) tuaient la souris à une dose inférieure à 0 c. c. 5 dans un cas et de 0 c. c. 25 dans l'autre, tandis que les filtrats n'ayant plus d'activité hémolytique (membranes de  $2R = 225 \text{ m}\mu$  et  $23 \text{ m}\mu$ ) ne tuaient pas la souris, même à la dose de 2 cent. cubes (dans cette série d'expériences, les inoculations ont été faites par voie intrapéritonéale, vu les grandes doses que nous avons dû injecter).

Quant au pouvoir toxique des filtrats des « toxines concentrées », le tableau II montre que tous les filtrats hémolytiques étaient également toxiques pour la souris, tandis que tous les filtrats dépourvus du facteur hémolytique n'étaient plus toxiques.

(3) Mais, même à titre hémolytique identique, l'hémolysine des « toxines concentrées » est moins facilement adsorbée que celle contenue dans le bouillon toxique non concentré.

ques pour la souris. Le même parallélisme subsiste pour les solutions des résidus. Nous reviendrons sur cette question au cours de la discussion des résultats de nos expériences.

**2° TOXINE DU *B. perfringens*, TYPE C (= *B. paludis*). [SOUCHE DE PROVENANCE ANGLAISE].** — Le tableau III montre que les membranes de  $2R = 110 \text{ m}\mu$  et même  $2R = 51 \text{ m}\mu$  laissent passer pour ainsi dire la totalité de l'hémolysine. Avec la membrane de  $2R = 29 \text{ m}\mu$ , il y a une rétention partielle de l'hémolysine. À partir de  $2R = 23,5 \text{ m}\mu$ , la rétention est totale dans tous nos essais, sauf dans 1 cas où une membrane de  $2R = 23 \text{ m}\mu$  a laissé passer une quantité minime d'hémolysine.

TABLEAU III. — Toxine du *B. perfringens* type C ("toxine concentrée").

MEMBRANE (2R en m $\mu$ )	HÉMOLYSE			POUVOIR TOXIQUE		
	Titre initial	Titre du filtrat	Titre du résidu	Titre initial	Titre du filtrat	Titre du résidu
110	500 ( $\pm 1.000$ )	500	—	10.000	++ 5.000 + — 10.000	—
51	250 ( $\pm 750$ )	100 ( $\pm 500$ )	0	6.000 (+ — 10.000)	Supérieur à 2.000	200
51	250 ( $\pm 500$ )	250	—	20.000	—	—
29	500 ( $\pm 2.500$ )	250 ( $\pm 500$ )	0	5.000	Supérieur à 2.000	500
23,5	500 ( $\pm 1.000$ )	0 *	250	10.000	200 (+ — 500)	4.000
23	2.500 ( $\pm 500$ )	40 ( $\pm 250$ )	2.500	10.000	2	6.000
23	250 ( $\pm 500$ )	0	50	20.000	20	3.000
23	1.000 ( $\pm 500$ )	0 *	100 ( $\pm 250$ )	5.000 (+ — 10.000)	50	200
17	250 ( $\pm 500$ )	0	250	20.000	20	3.000
10,7	500 ( $\pm 2.500$ )	0	( $\pm 100$ )	5.000	200	20
10,7	100 ( $\pm 500$ )	0	10 ( $\pm 50$ )	10.000	200	200
8,9	100 ( $\pm 500$ )	0	25 ( $\pm 50$ )	10.000	200	500
5,9	1.000 ( $\pm 500$ )	0 *	La filtration n'a pas été terminée.	5.000 (+ — 10.000)	100	La filtration n'a pas été terminée.

Explication des symboles : \*, voir dans le texte, p. 282;  $\pm$ , hémolysine partielle; ++, deux souris mortes (sur deux) en vingt-quatre heures; + —, une souris morte (sur deux), en vingt-quatre heures; —, n'a pas été fait.

Toutefois, nous avons observé, dans 3 cas, marqués d'un astérisque dans le tableau III, un phénomène particulier : sans qu'il y eût une hémolyse proprement dite, on pouvait constater dans un cas (membrane de  $2R = 23 \text{ m}\mu$ ) un léger éclaircissement de la suspension des hématies par le filtrat dilué au 1 : 10 et au 1 : 25 après vingt-quatre heures (quatre heures à  $37^\circ$ , ensuite à la température du laboratoire) ; dans un autre cas (membrane de  $2R = 5,9 \text{ m}\mu$ ), également après vingt-quatre heures seulement, un éclaircissement total par le filtrat dilué au 1 : 10 et un éclaircissement partiel par le filtrat dilué au 1 : 25 ; enfin, dans le troisième cas (membrane de  $2R = 23,5 \text{ m}\mu$ ) il y avait un éclaircissement partiel par le filtrat dilué au 1 : 25 après un séjour de quatre heures à  $37^\circ$  et, le lendemain, la suspension était devenue tout à fait transparente. Cependant, dans tous ces cas il n'y avait pas de coloration rouge du liquide, sa teinte était très nettement brunâtre.

En ce qui concerne le pouvoir toxique, le tableau III montre qu'il n'y a qu'une légère diminution du titre toxique des filtrats par rapport à celui des solutions initiales, tant qu'il s'agit de membranes laissant passer l'hémolysine. À partir de la membrane de  $2R = 23,5 \text{ m}\mu$  (c'est-à-dire la membrane la plus poreuse capable de retenir l'hémolysine) nous voyons une chute brusque et très prononcée du titre toxique des filtrats. Mais, contrairement à ce que nous avons observé dans nos expériences avec la toxine du type A, tous les filtrats sont restés toxiques, même celui de la membrane de  $2R = 3,9 \text{ m}\mu$ .

Au cours de nos expériences nous nous sommes demandé si la mort des souris était due, dans ces cas, à l'action d'une vraie toxine ou bien si elle n'était que l'effet d'un facteur introduit par nous au cours de nos manipulations (teneur élevée en  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ , acidité, etc.). Nous avons été amenés à nous poser cette question tout d'abord parce que toutes les souris ayant reçu, par voie intraveineuse, 0 c. c. 5 et même 0 c. c. 1 des filtrats de notre « toxine concentrée » présentaient toujours le même phénomène : convulsions d'une très grande violence et mort presque instantanée. Nous avons, tout d'abord, procédé à l'expérience de la neutralisation de ces filtrats par l'antitoxine spécifique. L'injection à des souris d'un mélange de 0 c. c. 1 d'un filtrat provenant d'une membrane de  $2R = 23 \text{ m}\mu$  ayant un titre toxique de 50, et de 0 c. c. 2 d'antisérum spécifique (de 600 U. A. T.), quantité 480 fois supérieure à la dose théoriquement neutralisante, tuait la souris très rapidement (quelques secondes, jusqu'à

quelques minutes). Notre filtrat de « toxine concentrée » n'était donc pas neutralisable par l'antitoxine spécifique même en grand excès. Pour élucider si ce phénomène n'était pas dû à un facteur non spécifique, nous avons, tout d'abord, établi la teneur d'un de nos échantillons (n° 3) de « toxine concentrée » en substances sèches totales. Celles-ci étant de 314 milligrammes par centimètre cube du filtrat, nous avons préparé une solution demi-saturée de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  [donc une solution dont la teneur en sulfate d'ammonium dépasse la teneur du filtrat en substances sèches totales : 350 milligrammes au lieu de 314 milligrammes] ; nous avons ajusté cette solution à un pH de 5,5 environ (ce pH correspond à l'acidité la plus forte de nos « toxines concentrées ») et nous avons procédé au titrage de l'action毒ique de cette solution. Comme le montre le tableau IV, cette solution acide de sulfate d'ammonium tue la souris, avec les mêmes symptômes que nos filtrats de « toxine concentrée » à la dose de 0 c. c. 05, mais ne tue pas à la dose de 0 c. c. 02. Par conséquent, lorsque le titre toxique de nos filtrats n'est pas inférieur à 50, leur toxicité ne peut être incriminée à la présence du  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ . L'expé-

TABLEAU IV. — Titrage du pouvoir toxique  
d'une solution demi-saturée de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; pH = 5,5.]

QUANTITÉ INJECTÉE (en cent. cube)	RÉSULTATS (sur 2 souris)
0,5 . . . . .	Convulsions très fortes. Mort presque instantanée des 2 souris.
0,05 . . . . .	Convulsions très fortes. Mort des 2 souris en quelques secondes.
0,02 . . . . .	Les 2 souris ont survécu.
0,01 . . . . .	Les 2 souris ont survécu.

rience résumée dans le tableau V montre, d'autre part, que l'activité toxique de nos filtrats est complètement neutralisable par l'antisérum homologue dès que la limite de la toxicité du  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  est dépassée, c'est-à-dire tant que le titre toxique n'est pas inférieur à 50. Pour les 3 cas dans lesquels le titre toxique était inférieur à ce chiffre (v. tableau III) nous ne pouvons affirmer avec certitude ni la présence, ni l'absence du facteur spécifique toxique. Cependant, ayant obtenu, même avec une membrane de  $2R = 5,9 \text{ m}\mu$  un filtrat dont le titre

TABLEAU V. — Neutralisation de la toxine du *B. perfringens* type C (filtrat provenant de la membrane de  $2R = 23,5 \text{ m}\mu$ ) par l'anti-sérum homologue.

MÉLANGE (en cent. cubes)	VOLUME INJECTÉ (en cent. cube)	RÉSULTATS (sur 3 souris)
0,1 de toxine. 4,9 de sérum dilué au 1/10.	0,5	Les 3 souris ont survécu.
0,1 de toxine. 4,9 de sérum dilué au 1/100.	0,5	Les 3 souris ont survécu.

*Témoins :*

0,1 de toxine. 4,9 de solution physiologique.	0,5	Mort rapide des 3 souris : l'une est morte en quelques minutes, les 2 autres après une demi-heure environ.
0,1 d'une solution demi-saturée de sulfate d'ammonium. 4,9 de solution physiologique.	0,5	Les 3 souris ont survécu.

toxique était de 100, nous sommes enclins à supposer le passage du facteur toxique dans tous les filtrats.

Le tableau III montre que les résidus restés sur les membranes laissant passer l'hémolysine ( $2R = 51 \text{ m}\mu$  et  $2R = 29 \text{ m}\mu$ ) ne présentent pas d'activité hémolytique. Par contre, tous les résidus correspondant aux filtrats dépourvus d'activité hémolytique (c'est-à-dire à partir de la membrane de  $2R = 23,5 \text{ m}\mu$ ) se sont montrés hémolytiques. Toutefois, nous ne sommes pas toujours parvenus à récupérer la totalité de l'hémolysine dans les résidus.

#### DISCUSSION DES RÉSULTATS.

L'ultrafiltration, telle qu'elle est actuellement employée, peut servir, d'une part, pour la séparation de deux ou de plusieurs substances contenues dans un liquide et ayant des particules de dimensions différentes et, d'autre part, pour la détermination approximative des dimensions des particules de ces substances. Cependant, si intéressants et si importants que soient les résultats obtenus par ce procédé, il est indispensable de se rendre compte des limites du procédé et des causes d'erreurs possibles.

Lorsqu'on arrive à séparer, par ultrafiltration, les substances contenues dans un liquide en deux fractions, l'une restant sur la membrane et l'autre passant dans le filtrat, et ayant des propriétés différentes (par exemple l'une hémolytique et l'autre seulement toxique, mais non hémolytique), il est évident que cela démontre que le liquide contient au moins deux substances différentes, mais ne prouve nullement qu'il n'y a que deux substances actives. En effet, toutes les molécules ayant traversé la membrane ont nécessairement des dimensions suffisamment petites pour traverser les pores de la membrane en question. Ces molécules peuvent cependant ne pas être de dimensions égales et représenter, non pas une, mais plusieurs substances. Si nous considérons, à titre d'exemple, les résultats obtenus avec la toxine du type C, nous voyons que le filtrat est encore toxique même après avoir traversé une membrane de  $2R = 5,9 \text{ m}\mu$ . Nous pouvons en tirer la conclusion que la toxine du type C contient *au moins* un facteur toxique pouvant traverser cette membrane, mais nous ne pouvons pas affirmer qu'il n'y en a qu'un seul. En effet, il se peut qu'en utilisant des membranes encore moins poreuses et en envisageant d'autres propriétés biologiques ou chimiques, nous aurions pu séparer, toujours par le même procédé, des substances différentes et ayant des particules de dimensions différentes, mais toujours suffisamment petites pour ne pas être retenues par notre membrane-limite ( $2R = 5,9 \text{ m}\mu$ ).

D'autre part, la fraction retenue par une membrane contient au moins une substance, mais elle peut, le cas échéant, en contenir deux ou plusieurs. En effet, si les dimensions des particules de deux ou de plusieurs substances sont très rapprochées, les particules plus grandes peuvent colmater la membrane et empêcher le passage des particules légèrement plus petites.

L'ultrafiltration peut donc nous renseigner d'une façon précise sur la quantité minima des différentes substances contenues dans un liquide, mais elle ne nous permet pas d'affirmer qu'il n'y en a pas davantage.

Lorsqu'on se sert de l'ultrafiltration pour déterminer les dimensions approximatives des particules, on détermine le « point terminal de filtration » (« filtration end-point »), c'est-

à-dire la membrane la plus poreuse qui retient la totalité de la substance en question dans les conditions optima de filtration [3, 7]. Les relations empiriques établies par Elford [3] permettent d'assigner, aux particules de la substance étudiée, une valeur suivant le diamètre moyen des pores de la membrane représentant le « point terminal de filtration ». Or, la détermination expérimentale du « point terminal de filtration » présente quelques difficultés dont il faut également tenir compte pour éviter des erreurs dans l'interprétation des résultats [3, 7]. Rappelons tout d'abord une des causes d'erreurs possibles dont nous avons déjà parlé plus haut : le colmatage des membranes par des particules plus grandes que celles de la substance étudiée. Ensuite, c'est l'adsorption par la membrane, dont l'intensité suivant les conditions peut varier entre des limites assez larges, qui peut être la cause d'erreurs considérables. Il est évident que la manifestation de l'adsorption est plus grande lorsque le liquide est pauvre en particules de la substance à étudier que quand il s'agit d'une solution ayant une teneur élevée en cette substance. Nous rappelons ici, à ce propos, la différence entre les résultats obtenus par nous pour la filtrabilité de l'hémolyse de la toxine du type A non concentrée et de la « toxine concentrée ». L'adsorption peut varier aussi suivant le pH du liquide et suivant sa concentration en sels. On peut diminuer l'adsorption en se servant de certaines substances, telles que : bouillon incomplètement digéré (par exemple « Hartley's broth »), sels biliaires, etc. [3, 4, 7, 9].

Ces considérations générales nous faciliteront l'interprétation de nos résultats expérimentaux. Rappelons tout d'abord que Stewart et Clampit [45] se sont également servis de l'ultrafiltration fractionnée pour séparer le facteur hémolytique du facteur non hémolytique, purement toxique, des toxines du *B. perfringens*, types A et C. Cette séparation aurait réussi dans les deux cas, bien qu'elle ait été moins manifeste pour la toxine du type A que pour la toxine du type C.

Comme nous l'avons déjà mentionné (v. aussi tableaux I et II), nous n'avons pas pu mettre en évidence cette séparation des deux facteurs (hémolytique et non hémolytique, purement toxique) de la toxine du type A. En effet, toutes les

fois que l'hémolysine a été retenue par les membranes ultrafiltrantes, les filtrats ne tuaient plus la souris. En admettant que les deux facteurs correspondent à deux substances distinctes (ce qui semble être établi) ce fait peut être interprété de deux façons différentes : ou bien la substance purement toxique a des molécules de dimensions égales ou très voisines de celles de l'hémolysine, et elle est complètement retenue par la même membrane que l'hémolysine, ou bien la substance purement toxique n'est pas à une concentration suffisamment élevée dans les filtrats non hémolytiques pour tuer, à elle seule, la souris. En d'autres termes, la souris ne serait pas, dans ce cas, un indicateur suffisamment sensible pour déceler la présence de ce facteur dans les filtrats dépourvus d'hémolysine. Si hypothétique que soit cette explication, nous tenons à insister un peu sur cette possibilité. En effet, si nous comparons les résultats obtenus par nous pour la « toxine concentrée » du type A (tableau II) avec ceux obtenus pour la « toxine concentrée » du type C (tableau III), nous voyons, d'abord que le facteur hémolytique, aussi bien que le facteur non hémolytique, purement toxique, de la toxine du type C sont beaucoup plus actifs (ou présents à une concentration plus élevée) que les facteurs correspondants de la toxine du type A ; ainsi, par exemple, la dose minima mortelle de la toxine du type C varie entre 0 c. c. 0002 et 0 c. c. 00005 et celle de la toxine du type A est de 0 c. c. 05 à 0 c. c. 025. Nous voyons ensuite, dans le cas de la toxine du type C, une chute considérable du pouvoir toxique des filtrats dès qu'ils sont débarrassés de l'hémolysine. Si, même, nous ne tenons pas compte des filtrats ayant un titre toxique inférieur à 50 (4), nous constatons que le titre toxique des filtrats de la toxine du type C dépourvus de l'hémolysine représente au maximum 1 à 4 p. 100 du titre toxique de la solution initiale.

Si dans le cas de la toxine du type A, l'élimination, par filtration, de l'hémolysine amène une diminution du titre toxique du même ordre de grandeur, c'est-à-dire qu'il ne reste que 1 à 4 p. 100 de la toxicité initiale, ces filtrats non hémolytiques

(4) C'est-à-dire les filtrats pour lesquels nous ne pouvons pas affirmer avec certitude s'il s'agit d'une toxicité vraie ou seulement de l'action toxique du  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  et de l'acidité du filtrat (v. p. 283).

lytiques ne contiendraient que 0,4 à 1,6 doses minima mortelles par centimètre cube. Donc 0 c. c. 5 (quantité qu'on évite généralement de dépasser en faisant des injections intraveineuses à la souris) contiendrait moins d'une dose minima mortelle et ne tuerait pas la souris. Nos expériences montrent que dès que les filtrats ne contiennent plus d'hémolysine il y a aussi une chute brusque du titre toxique et que ces filtrats ne tuent plus la souris aux doses employées. Or, ces doses étaient telles que, si les filtrats contenaient 6 p. 100 de la toxicité des solutions initiales, elles devaient tuer la souris. Nous pouvons donc dire que, même si les filtrats non hémolytiques contiennent une substance purement toxique, sa toxicité représente en tout cas moins de 6 p. 100 de la toxicité des solutions initiales. Il s'ensuit, par conséquent, que les deux possibilités subsistent : la substance purement toxique peut avoir des dimensions ou bien analogues, ou bien inférieures à celles de l'hémolysine. Quoi qu'il en soit, du point de vue expérimental, nous n'avons pas pu confirmer les résultats obtenus par Stewart et Clampit en ce qui concerne le passage du facteur toxique de la toxine du type A à travers des membranes retenant la totalité de l'hémolysine.

Quant au « point terminal de filtration » de l'hémolysine de la toxine du type A, Stewart et Clampit n'indiquent pas le diamètre moyen des pores de leur membrane ayant retenu l'hémolysine.

Pour effectuer la détermination du « point terminal de filtration » il aurait fallu rechercher les conditions d'optimum de filtrabilité en faisant varier le pH des solutions et en ajoutant des substances diminuant l'adsorption (5). Afin d'éviter l'altération de la toxine par de telles opérations, nous avons recherché le « point terminal de filtration » en nous basant sur la récupération totale de l'hémolysine dans le résidu resté sur les membranes. La récupération totale doit signifier qu'il n'y a pas eu d'adsorption et que, par conséquent, la membrane en question correspond bien au « point terminal de filtration ».

(5) Cependant, il est probable que le bouillon Vf, étant un bouillon incomplètement digéré, contient de tels produits.

Nous n'avons pu récupérer la totalité de l'hémolysine dans les résidus qu'à partir de la membrane de  $2R = 23 \text{ m}\mu$ . Bien que les filtrats aient été dépourvus d'hémolysine après passage des solutions à travers des membranes plus poreuses ( $2R = 240 \text{ m}\mu$ , pour la toxine non concentrée, et  $2R = 52 \text{ m}\mu$ , pour la « toxine concentrée »), c'est la membrane ayant  $2R = 23 \text{ m}\mu$  que nous considérons comme représentant le « point terminal de filtration ». Nous pensons, en effet, que l'absence d'hémolysine dans les filtrats provenant de membranes plus poreuses est due à son adsorption par les membranes (6).

Si nous admettons comme « point terminal de filtration » de l'hémolysine la membrane de  $2R = 23 \text{ m}\mu$  et que nous nous basions sur les relations empiriques établies par Elford [3], nous pourrons attribuer aux particules de l'hémolysine du type A des dimensions de l'ordre de 7 à 9  $\text{m}\mu$ , ce qui correspondrait à un poids moléculaire d'environ 300.000, en supposant que l'hémolysine se présente sous forme de molécules protéïdiques sphériques. Cependant, ces relations ont été établies par Elford en se basant sur l'absence dans les filtrats des substances étudiées, tandis que nous nous basons ici, pour préciser le « point terminal de filtration » sur la récupération de l'hémolysine dans le résidu. Il subsiste donc une certaine incertitude quant aux dimensions des particules de l'hémolysine de la toxine du type A.

En ce qui concerne la toxine du type C, nous avons déjà vu qu'il y a une chute très brusque de son pouvoir toxique dès que l'hémolysine est retenue (membrane de  $2R = 23,5 \text{ m}\mu$ ), mais que les filtrats restent nettement toxiques, même ceux provenant de membranes de  $2R = 5,9 \text{ m}\mu$ . Nous n'avons pas employé de membranes moins poreuses et nous n'avons donc pas atteint la limite de filtrabilité du facteur purement toxique. Toutefois, nous pouvons déduire de nos constatations qu'il s'agit ici de molécules de dimensions sûrement plus petites que celles de l'ovalbumine, cette dernière étant complètement retenue par des membranes de  $2R = 5,5-6,0 \text{ m}\mu$  [4, 9].

(6) L'intérêt que peut présenter l'examen des résidus restés sur les membranes ultrafiltrantes a été démontré dans les expériences faites sur l'invertine du suc intestinal du chien (Grabar [8]).

D'après Stewart et Clampit le facteur hémolytique de la toxine du type C serait entièrement retenu par une membrane de  $2R = 50 \text{ m}\mu$  environ. Cette séparation des deux facteurs (l'un hémolytique, l'autre purement toxique) ne s'est produite dans nos expériences qu'à partir des membranes de  $2R = 23,5 \text{ m}\mu$ . Nous supposons que cette divergence des résultats est due au fait que nous nous sommes servis de la « toxine concentrée ». Nous avons donc travaillé dans des conditions où l'adsorption est moins manifeste.

Mais avons-nous vraiment atteint, avec la membrane de  $2R = 23,5 \text{ m}\mu$ , le « point terminal de filtration » de l'hémolysine, ou bien cette limite de filtrabilité est-elle due également à l'adsorption ? Comme le montre le tableau III, les solutions des résidus, complètement dépourvues d'hémolysine même dans le cas de la membrane de  $2R = 29 \text{ m}\mu$ , sont toutes hémolytiques à partir de la membrane de  $2R = 23,5 \text{ m}\mu$  et la totalité de l'hémolysine a pu être récupérée deux fois dans le résidu (membranes de  $2R = 23 \text{ m}\mu$  et  $2R = 17 \text{ m}\mu$ ) ; dans les autres cas nous avons constaté une récupération seulement partielle. Il n'est donc pas impossible qu'une partie de l'hémolysine ait été adsorbée par la membrane. Cependant, dans presque toutes nos expériences avec la toxine du type C, nous avons ultrafiltré nos liquides à sec et les membranes ont ensuite été lavées deux ou trois fois avec de la solution physiologique en faisant passer ce liquide à travers les membranes. (Tandis que dans le cas de la toxine du type A, nous avons arrêté les filtrations lorsqu'il restait encore quelques gouttes de liquide sur les membranes.) La perte essentielle de l'hémolysine pourrait donc être due à une décomposition ou une inactivation de l'hémolysine au cours de ces manipulations. Nous sommes enclins à croire que le « point terminal de filtration » de l'hémolysine du type C est très voisin de  $2R = 23 \text{ m}\mu$ . Le fait d'avoir pu récupérer la totalité de l'hémolysine nous confirme dans cette façon de voir.

Nous avions espéré pouvoir continuer ces recherches, mais les circonstances actuelles nous en ont empêchés; nous avons alors décidé de publier les résultats acquis.

## CONCLUSIONS.

L'application du procédé de l'ultrafiltration fractionnée à l'étude des toxines du *B. perfringens* nous a permis de faire les constatations suivantes :

1° Le « point terminal de filtration » du facteur hémolytique de la toxine du *B. perfringens* type A correspond à la membrane de  $2R = 23 \text{ m}\mu$ . On peut attribuer à cette hémolysine, sous certaines réserves, des dimensions d'environ 7 à 9  $\text{m}\mu$  et un poids moléculaire de l'ordre de 300.000.

2° Nous ne sommes pas parvenus à séparer, par ultrafiltration fractionnée, le facteur hémolytique du facteur non hémolytique, purement toxique, de la toxine du *B. perfringens* du type A, ce qui peut faire penser qu'ils ont des dimensions analogues. Il est possible, néanmoins, que les filtrats dépourvus d'hémolysine contiennent une certaine quantité de facteur purement toxique, mais que son activité (ou sa concentration) soit trop faible pour tuer la souris.

3° Le facteur hémolytique peut être séparé du facteur non hémolytique, purement toxique, dans le cas de la toxine du *B. perfringens* du type C. Le « point terminal de filtration » de l'hémolysine est voisin de  $2R = 23 \text{ m}\mu$ ; pour des raisons exposées dans le texte, nous préférons considérer cette donnée comme pouvant ne pas être définitive.

4° Nous n'avons pas atteint le « point terminal de filtration » du facteur purement toxique de la toxine du type C. Mais ayant constaté qu'il passe même à travers une membrane de  $2R = 5,9 \text{ m}\mu$ , nous en déduisons que les dimensions de ses molécules sont semblables ou, plus vraisemblablement, inférieures à celles de l'ovalbumine. Nous pouvons donc affirmer que la toxine du *B. perfringens* du type C contient au moins deux substances toxiques différentes (l'une purement toxique, l'autre hémolytique), mais le procédé employé ne nous donne aucune preuve qu'il n'y en a pas davantage.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] BORTHWICK (G. R.). *Zentralbl. f. Bakt., Orig.*, **134**, 1935, p. 89.
- [2] ELFORD (W. J.). *Journ. of Path. a. Bact.*, **34**, 1931, p. 505.
- [3] ELFORD (W. J.). *Proc. Roy. Soc., B.*, **112**, 1933, p. 384.
- [4] ELFORD (W. J.) et FERRY (J. D.). *Biochem. Journ.*, **30**, 1936, p. 84.
- [5] GLENNY, BARR, LLEWELLYN-JONES, DALLING et ROSS. *Journ. of Path. a. Bact.*, **37**, 1933, p. 53.
- [6] GRABAR (P.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **17**, 1935, p. 965.
- [7] GRABAR (P.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **17**, 1935, p. 1245.
- [8] GRABAR (P.). *C. R. Soc. Biol.*, **118**, 1935, p. 455.
- [9] GRABAR (P.). *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **4**, 1938, p. 252.
- [10] HENRY (H.). *Journ. of Path. a. Bact.*, **26**, 1923, p. 497.
- [11] LEVENSON (S.) et GRABAR (P.). *C. R. Soc. Biol.*, **132**, 1939, p. 210.
- [12] MC GAUGHEY (C. A.). *Journ. of Path. a. Bact.*, **36**, 1933, p. 263.
- [13] PRIGGE (R.). *Zeitschr. f. Immun.*, **89**, 1936, p. 477 ; **91**, 1937, p. 457.
- [14] SCHNEIERSON (S. S.) et GRABAR (P.). *C. R. Soc. Biol.*, **130**, 1939, p. 1451.
- [15] STEWART (S. E.) et CLAMPIT (J. M.). Réunion des sérologistes (28-30 septembre 1938) de la Commission permanente de standardisation biologique de la Société des Nations.
- [16] WEINBERG (M.) et BAROTTE (J.). Ces *Annales*, **43**, 1929, p. 453.
- [17] WEINBERG (M.) et COMBIESCO (N.). Ces *Annales*, **45**, 1930, p. 547.
- [18] WEINBERG (M.) et GUILLAUMIE (M.). *Rev. d'Immunol.* 1936, p. 513 ; 1939, p. 5.
- [19] WEINBERG (M.) et KEPINOFF. *C. R. Ac. Sc.*, **172**, 1921, p. 880.
- [20] WEINBERG (M.) et NASTA (M.). Ces *Annales*, **34**, 1920, p. 690.
- [21] WEINBERG (M.) et SEGUIN (P.). La gangrène gazeuse. *Monographies de l'Institut Pasteur*. 1 vol., Masson, édit., Paris, 1918.
- [22] WILSDON (A. J.). *Second report of the Director of the Institute of Animal Pathology*. Cambridge, 1931, p. 53.

**RECHERCHES**  
**SUR LA TENEUR DES PRODUITS TUBERCULEUX**  
**EN BACILLES DE KOCH**

par ALFRED BOQUET et EGIDIO LENCI.

*(Institut Pasteur, Laboratoires de recherches  
sur la tuberculose.)*

La numération des bacilles de Koch dans les produits pathologiques, en particulier dans les crachats, présente un double intérêt : d'abord du fait que l'abondance de l'élimination bacillaire est en relation avec l'évolution des lésions tuberculeuses, ensuite parce qu'elle permet de mesurer les risques de la contagion qu'un malade tousser et cracheur est susceptible de répandre autour de lui.

Un grand nombre de techniques ont été proposées pour cette fin, depuis celle de Gaffky (1) [1884], qui consiste à compter dans un certain nombre de champs microscopiques les bacilles des crachats étalés sur lame et colorés par la méthode de Ziehl Neelsen. En 1891, Nuttall (2) préconisa le traitement préalable des crachats par la soude en vue de les rendre homogènes pour l'étalement sur lame de verre et, en 1910, Chaussé (3) obtint des résultats d'une grande précision en opérant comme il suit : on dilue les crachats à un titre connu et on en étale un poids déterminé sur un rectangle tracé sur une lame de verre ; on laisse sécher la lame posée horizontalement, on fixe dans la flamme et on colore. Pour la numération, on se sert d'un oculaire quadrillé et on rapporte la teneur en bacilles au milligramme de produit frais. L'examen ne doit porter que sur des mucosités purulentes, car la salive des tuberculeux ne contient que de très rares bacilles.

(1) *Mitt. a. d. Kais. Gesund.*, **2**, 1884, p. 126.

(2) *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **2**, 1891, p. 67.

(3) *C. R. Soc. de Biol.*, **68**, 1910, p. 673 ; *Ces Annales*, **28**, 1914, p. 608.

Chez les phthisiques à la troisième période, les teneurs les plus fréquentes ainsi calculées par Chaussé, varient de 5.000 à 30.000 bacilles par milligramme de crachats, mais certains malades en éliminent jusqu'à 100.000 et 120.000 par milligramme et cela pendant des mois.

De très nombreuses modifications ont été apportées dans la suite à ces procédés pour mieux homogénéiser les produits à examiner ou pour concentrer les bacilles dans un très petit volume de liquide, ce qui devait faciliter leur recherche dans les frottis. Mais les meilleures de ces techniques comportent encore une grande marge d'imprécision, tout en nécessitant des examens au microscope très minutieux et souvent très longs. C'est pourquoi nous avons essayé de les remplacer par la culture directe ou par l'inoculation au cobaye de dilutions homogènes et exactement titrées, faites à partir d'une quantité déterminée de produit suspect.

### I. — NUMÉRATION DES BACILLES PAR L'ENSEMENCEMENT DE DILUTIONS DE PRODUITS SUSPECTS.

Pour les crachats, le pus ou tout autre produit suspect liquide ou peu visqueux (4), on en prélève à la pipette 1 cent. cube que l'on dépose dans un verre stérile. On ajoute ensuite 9 cent. cubes de solution de soude à 4 p. 100 et on mélange très intimement au moyen d'une baguette de verre ou avec la pipette, par aspiration et refoulement, jusqu'à homogénéisation ou dissolution aussi complète que possible du produit. Le mélange est laissé à l'étuve à 37° pendant trente minutes et agité de temps en temps, puis homogénéisé de nouveau avec la pipette.

A partir de cette dilution-mère on fait une série de dilutions à 1 p. 10, 1 p. 100, 1 p. 1.000, etc., dans de l'eau distillée ou du liquide de Sauton dilué au quart, en changeant de pipette pour chaque opération, et on ensemence 0 c. c. 1 de chaque dilution, à partir de la troisième ou de la quatrième, sur 3 tubes de milieu à l'œuf de Löwenstein ou de Petragnani au vert malachite, ce qui correspond à 0 milligr. 1, 0 milligr. 01, 0 milligr. 001, etc., de produit. Le liquide ensemencé ayant été parfaitement étalé sur toute la surface du milieu, les tubes sont placés à l'étuve en position inclinée et obturés vingt-quatre heures plus tard avec un capuchon de caoutchouc.

On surveille l'apparition des colonies et on les dénombre un mois, six semaines et deux mois après l'ensemencement.

(4) *C. R. Soc. de Biol.*, **128**, 1938, p. 473 et 824.

Quand les produits à ensemencer sont trop consistants pour être aspirés dans une pipette graduée, ou s'il s'agit de tissu, on en découpe un fragment avec des ciseaux stériles, on le pèse (10 à 20 centigrammes) et on le broie au mortier, tel quel de préférence ou avec un peu de sable. On ajoute goutte à goutte 1 ou 2 cent. cubes de la solution de soude à 4 p. 100 en agitant et en incorporant soigneusement tout le tissu broyé à la solution alcaline ; on porte à l'étuve et on fait les mêmes séries de dilutions et les mêmes ensemencements que précédemment.

Dans quelques cas, la suspension en solution sodique a été neutralisée par l'acide sulfurique avant d'être diluée, mais l'expérience nous a montré que cette précaution n'est pas nécessaire à partir de la troisième dilution.

Les résultats des ensemencements ainsi effectués sont résumés dans les tableaux I et II.

TABLEAU I. — **Pus bacillifères.**

NATURE du produit ensemencé	QUANTITÉ DE PRODUIT ENSEMENCÉ PAR TUBE (en milligrammes)				
	10	1	0,1	0,01	0,001
	Nombre moyen de colonies par tube				
Pus d'arthrite . . . .		50	4	2	0
Pus d'arthrite . . . .			30	2	0
Pus d'arthrite . . . .		0	0	0	0
Pus d'arthrite . . . .	3	0			
Pus d'arthrite . . . .	30	1	0		
Pus d'ostéite . . . .		1	0		
Pus d'ostéite . . . .		10	2	0	0
Pus d'ostéite . . . .		0	0		
Pus d'ostéite . . . .	30	7			
Pus de mal de Pott .		20	4	0	0
Pus de mal de Pott .	20	4	0		
Pus d'abcès froid . .	20	4			

TABLEAU II. — Crachats (1).

FORME CLINIQUE DE LA TUBERCULOSE	QUANTITÉ de crachats émis en 24 heures (en cent. cubes)	QUANTITÉ DE PRODUIT ENSEMBLÉ par tube (en milligramme)			
		0,01	0,001	0,0001	0,00001
		Nombre moyen de colonies par tube			
Ulcéro-nodulaire. Etat général grave . . .	100	20	2		
Ulcéro-nodulaire. Etat général grave . . .	20	2			
Ulcéro-nodulaire. Etat général grave . . .	1	0	0		
Ulcéro-nodulaire. Etat général grave . . .	30	4	0		
Ulcéro-nodulaire. Etat général grave . . .	20	4	0		
Ulcéro-nodulaire. Etat général grave . . .	40	3	0		
Ulcéro-nodulaire. Etat général grave . . .	30	9	1		0
Ulcéro-nodulaire. Etat général grave . . .	35	7	0	17	1
Ulcéro-nodulaire. Etat général grave . . .	35	6	3	0	
Ulcéro-nodulaire. Etat général grave . . .	50	55	0		
Nodulaire. Etat général satisfaisant . . .	30	1	0	0	0
Ulcéro-nodulaire. Etat général assez grave.	20	3	0	0	0
Condensation du lobe supérieur droit. Etat général satisfaisant . . . . .	25	5	1	0	0
Pneumo-thorax bilatéral. Etat général assez grave . . . . .	35	25	2	0	0
Sans indications . . . . .			5	1	
Ulcéro-nodulaire grave . . . . .	80		18	1	0
Ulcéro-nodulaire grave . . . . .	50			6	1
Ulcéro-nodulaire. Etat satisfaisant. Examen des crachats négatif	30	0	0	0	0
Ulcéro-nodulaire. Etat général médiocre .	100	1	0	0	0
Ulcéro-nodulaire. Etat général grave .	100	5	0	0	0
Ulcéro-nodulaire. Etat général satisfaisant.	45	25	1	1	0
Ulcéro-nodulaire. Etat général satisfaisant.	25	10	2	1	0
Ulcéro-nodulaire. Etat général médiocre .	30	41	4	1	0
Caverne étendue et dilatation bronchique.					
Etat général grave . . . . .	200	75	12	1	0
Ulcéro-nodulaire. Etat général satisfaisant.	45	0	0	0	0
Ulcéro-nodulaire. Etat général médiocre .	40	2	1		
Ulcéro-nodulaire. Etat général satisfaisant.	45		2		
Ulcéro-nodulaire. Etat général médiocre .	20	10	1	0	0
Ulcéro-nodulaire. Etat général satisfaisant.	45	0	0	0	0
Ulcéro-nodulaire . . . . .	50	15	1	1	0
Ulcéro-nodulaire . . . . .	25		7	1	0
Ulcéro-nodulaire . . . . .	30		15	1	0
Ulcéro-nodulaire. Etat général satisfaisant.	90	5	1		
Ulcéro-nodulaire. Etat général grave . . .	40		25	3	0
Ulcéro-nodulaire. Etat général grave . . .	50	5	0	0	0
Ulcéro-exsudative. Etat général médiocre .	40	85	14	4	
Ulcéro-nodulaire. Etat général grave . . .	70	45	4	1	0
Ulcéro-nodulaire. Etat général grave . . .	100	43	1	0	0
Nodulaire et hydro-pneumothorax. Etat satisfaisant . . . . .	45	4	0	0	0

(1) Nous exprimons tous nos remerciements à M. le Dr Amenille, médecin de l'hôpital Cochin et à M. le Dr Canetti, qui ont bien voulu mettre à notre disposition les produits employés dans ces recherches.

Sur les 39 crachats ensemencés comme il vient d'être indiqué :

- 2 contenaient au minimum 100.000 bacilles par milligramme.
- 15 contenaient entre 10.000 et 100.000 bacilles par milligramme.
- 13 contenaient entre 1.000 et 10.000 bacilles par milligramme.
- 6 contenaient entre 100 et 1.000 bacilles par milligramme.
- 3 contenaient moins de 100 bacilles par milligramme.

Ces trois derniers crachats provenaient de malades dont l'état semblait sérieusement amélioré. Dans les 37 autres cas, l'élimination bacillaire était le plus souvent d'autant plus abondante que les lésions pulmonaires étaient plus étendues et plus graves. Il convient cependant de remarquer à ce propos que certains malades dont l'état général paraissait satisfaisant, continuaient à expectorer un nombre considérable de bacilles, jusqu'à 10.000 par milligramme pour deux d'entre eux.

## II — NUMÉRATION DES BACILLES PAR L'INOCULATION DE DILUTIONS DE PRODUITS SUSPECTS.

Si élevés qu'ils soient, les nombres qui précèdent peuvent cependant être dépassés par ceux que l'on détermine en inoculant au cobaye des dilutions de produits bacillifères.

Pour trois échantillons de pus tuberculeux, qui furent inoculés au cobaye par voie sous-cutanée, à raison de 3 ou 4 animaux pour chaque dilution, voici ce que nous avons constaté :

TABLEAU III.

NATURE DU PRODUIT INOCULÉ	TITRE DES DILUTIONS PAR CENTIMÈTRE CUBE en milligramme et résultats des inoculations		
	0,01	0,001	0,0001
Pus abcès froid. . . . .	+++	000	000
Pus abcès (1). . . . .		000	000
Pus ostéo-arthrite. . . . .	+++		000

(1) La culture de ce pus a été positive pour la suspension contenant 1 milligramme de produit par centimètre cube.  
+, animal mort avec des lésions tuberculeuses; 0, animal mort sans lésions tuberculeuses.

En ce qui concerne les crachats, tous les échantillons qui contenaient des bacilles visibles à l'examen microscopique ont tuberculisé tous les cobayes inoculés à la dose de 0 milligr. 01 et 0 milligr. 0001.

2 échantillons sur 2 se sont montrés infectants à la dose de 0 milligr. 00004.

1 échantillon sur 2 s'est montré infectant à la dose de 0 milligr. 000002.

Aucun n'a tuberculisé le cobaye à la dose de 0 milligr. 000001.

La teneur maximum de ces produits était donc de 500.000 bacilles vivants et virulents par milligramme, soit 500.000.000 par centimètre cube.

Ces résultats, qui sont d'ailleurs très voisins de ceux que Chaussé avait obtenus par le procédé de la numération directe sur lame de verre, mettent bien en évidence l'extrême richesse des crachats et la pauvreté relative des pus tuberculeux en bacilles de Koch. Or, il ressort d'un très grand nombre de titrages par l'inoculation au cobaye que la quantité moyenne de bacilles tuberculeux vivants du type humain par milligramme de culture est comprise entre 30 millions et 100 millions (A. Calmette l'avait estimée à 40 millions), en admettant qu'un seul germe soit capable d'infecter régulièrement le cobaye par la voie sous-cutanée. De ce fait, les malades qui rejettent 50 cent. cubes de crachats peuvent éliminer chaque jour de 10 à 100 milligrammes et jusqu'à 250 milligrammes de bacilles vivants, ce qui représente, dans ce dernier cas, le tiers d'une culture sur pomme de terre au maximum de sa végétation.

L'abondance de l'élimination bacillaire par les crachats traduit d'une façon directe et immédiate la pullulation des germes dans les lésions pulmonaires, pullulation qui se poursuit avec une très grande intensité à partir du moment où, comme l'ont constaté M. Lurie (5) et E. Long (6), les foyers commencent à subir la fonte caséuse. Il se produit alors, dans la zone tissulaire en voie de dégénérescence, une véritable culture, comparable à celle que l'on obtient sur les milieux artificiels ; et cette culture se renouvelle incessamment pendant toute l'évolution du processus.

(5) *Journ. Exper. Med.*, 57, 1933, p. 181.

(6) *Journ. Amer. Med. Assoc.*, 104, 1935, p. 1883.

Les expériences résumées dans le tableau IV donnent la mesure de cette végétation envahissante du bacille de Koch dans les lésions pulmonaires de l'homme dont il a suffi d'inoculer 0 milligr. 001 sous la peau de 3 cobayes pour les tuberculiser en moins de deux mois, avec des lésions aussi nombreuses que celles qu'aurait produites une quantité égale de cultures.

Au contraire, l'inoculation de fragments de lésions spléniques, hépatiques et ganglionnaires de cobayes a montré qu'elles étaient généralement assez pauvres en bacilles virulents.

TABLEAU IV.

NATURE DU PRODUIT INOCULÉ	TITRE DES DILUTIONS INOCULÉES en milligramme et résultats des inoculations				
	0,01	0,001	0,0001	0,00001	0,000001
Lésion pulmonaire de l'homme . . .	+++	+++			
Lésion pulmonaire de l'homme . . .	+++	+++			
Lésion pulmonaire de l'homme . . .	+++	+++			
Lésion pulmonaire de l'homme . . .	+++	+++			
Lésion pulmonaire du cobaye . . .	+++	+++			
Lésion hépatique du cobaye A . . .	000	000	++	+++	+++
Lésion ganglionnaire (sous-lombaire) du cobaye A (b. bovin) . . . . .			000		
Lésion splénique du cobaye B . . . .	000	000	000		
Lésion ganglionnaire (inguinale) du du cobaye B (b. bovin) . . . . .	000	000	000		

Il en va de même pour les lésions caséo-calcaires des ganglions tuberculeux du bœuf et surtout du porc. Toutes celles que nous avons inoculées (tableau V) ont tuberculisé le cobaye à la dose relativement élevée de 0 milligr. 1, mais 1 sur 6 s'est montrée inoffensive à la dose de 0 milligr. 01, 2 n'ont infecté que 1 cobaye sur 3 à la même dose et 3 seulement sur 6 ont été pathogènes à la dose de 0 milligr. 001.

Ces recherches, qui méritent, croyons-nous, d'être étendues et multipliées, font apparaître l'intérêt qui s'attache à l'emploi de techniques simples mais aussi précises que possible dans l'étude quantitative de l'infection tuberculeuse, non seulement dans sa phase ultime, comme dans la plupart des cas

TABLEAU V.

NATURE DU PRODUIT INOCULÉ	TITRE DES DILUTIONS INOCULÉES en milligramme et résultats des inoculations		
	0.1	0,01	0,001
Ganglion de bœuf. . . . .	+++	+++	+++
Ganglion de bœuf. . . . .	+++	+ 0	00
Ganglion de bœuf. . . . .	+++	+++	+++
Ganglion de bœuf. . . . .	+++	+++	+++
Ganglion de porc. . . . .	+++	+ 00	000
Ganglion de porc. . . . .	+++	000	000

auxquels nous avons dû nous limiter, mais à tous les stades, depuis la primo-infection du nourrisson jusqu'aux formes souvent torpides de la tuberculose pulmonaire des vieillards. Il est vraisemblable que de tels examens, pratiqués à des intervalles convenables sur un même sujet et portant soit sur les crachats, soit sur le liquide de lavage d'estomac, apporteraient des éléments d'information précieux pour le pronostic ; ils permettraient aussi, parfois, d'assister à la stérilisation graduelle des lésions pulmonaires, de vérifier périodiquement la solidité de cette guérison locale et, éventuellement, de contrôler le développement épisodique ou durable des surinfections.

Du point de vue prophylactique, les résultats que nous avons ainsi obtenus montrent la gravité du danger que les tuberculeux font courir à leur entourage lorsqu'ils ne se soumettent pas à la prescription hygiénique élémentaire de ne pas semer autour d'eux ces myriades de bacilles d'une redoutable virulence que contiennent leurs crachats.

**SUR LA SÉPARATION DES ANTICORPS LIPOÏDIQUES  
POLYSACCHARIDIQUES ET PROTÉIDIQUES  
DES SÉRUMS TUBERCULEUX  
AU MOYEN  
DE LA RÉACTION DE L'INHIBITION SPÉCIFIQUE**

par W. SCHAEFER.

(*Institut Pasteur, Laboratoires de recherches  
sur la tuberculose.*)

De nombreux exemples ont montré que l'injection de corps bacillaires dans un organisme animal provoque la formation de plusieurs espèces d'anticorps dont chacune correspond à un composant antigénique particulier des bacilles administrés. L'analyse de ces antigènes et des anticorps correspondants est d'un très grand intérêt tant au point de vue théorique que pratique.

Dans ce mémoire, nous nous proposons d'exposer les résultats de nos recherches sur les composants antigéniques des bacilles tuberculeux des mammifères et sur les divers anticorps que l'on peut mettre en évidence dans les sérums anti-tuberculeux. Nous insisterons particulièrement sur la méthode de séparation des anticorps parce qu'elle est différente des méthodes employées jusqu'à présent et parce que nous croyons qu'elle pourra être utilisée dans d'autres études.

Cette méthode est basée sur la réaction de l'inhibition (1) spécifique préconisée par K. Landsteiner. Elle part du fait que dans la plupart des réactions sérologiques, surtout quand il s'agit d'antigènes de grandeur moléculaire assez faible, l'antigène et l'antisérum doivent être mélangés dans une proportion optimum pour qu'il y ait apparition d'un flocculat spéci-

(1) LANDSTEINER (K.). *Bioch. Z.*, **93**, 1919, p. 117 et **104**, 1920, p. 280.

fique ou fixation de l'alexine. Si la quantité d'antigène ajoutée à l'antisérum dépasse considérablement ce rapport optimum, aucun précipité n'apparaît et il n'y a pas fixation de l'alexine (2). Pourtant l'antigène ajouté en excès sature l'anticorps correspondant. On peut s'en rendre compte par ce fait qu'un sérum, capable de réagir avec deux antigènes différents, auquel on ajoute un excès de l'un de ces antigènes, ne réagit plus, dans la suite, avec aucune quantité de cet antigène tandis qu'il continue de réagir, comme auparavant, avec l'autre antigène.

L'effet inhibiteur de certains haptènes de grandeur moléculaire faible a été utilisé par K. Landsteiner pour la détermination de leur spécificité sérologique. Si ces substances sont capables d'inhiber la réaction d'un antisérum avec l'antigène correspondant, on peut conclure qu'elles possèdent une configuration chimique analogue à celle de l'antigène spécifique. La méthode a été utilisée surtout pour l'analyse de la spécificité chimique de certains antigènes synthétiques.

Mais on peut encore employer la réaction de l'inhibition spécifique pour la saturation des anticorps et, en particulier, pour la saturation sélective d'un des anticorps que peut contenir un sérum donné. On peut ainsi conférer à des sérums réagissant à l'origine avec plusieurs antigènes, une spécificité stricte pour un seul d'entre eux. Cette méthode supplée donc la méthode d'absorption des anticorps. Mais tandis que cette dernière n'est applicable qu'à certains antigènes corpusculaires complexes tels que des corps microbiens ou à des antigènes solubles fixés artificiellement, par adsorption, sur un support solide (kaolin, charbon animal) [d'Alessandro et Sofia (3), K. Meyer et A. Pic (4)], la saturation par inhibition spécifique doit être effectuée avec des antigènes parfaitement solubles. Il est essentiel, pour obtenir le phénomène d'inhibition, que l'antigène se trouve à l'état de solution parfaite,

(2) Le mécanisme physico-chimique de ce phénomène a été étudié par J. MARRACK (*Special reports. Ser. med. Res. Coun.*, n° 194, Londres), et par M. HEIDELBERGER et KENDALL (*J. exp. med.*, **67**, 1935, p. 563).

(3) D'ALESSANDRO (G.) et SOFIA (F.). *Z. f. Immunittätsf.*, **84**, 1935, p. 245.

(4) MEYER (K.) et PIC (A.). *Ces Annales*, **56**, 1936, p. 401.

que ses molécules soient assez petites et à une concentration assez forte par rapport à celle des anticorps.

MÉTHODES DE PRÉPARATION DES ANTIGÈNES  
POUR LA MISE EN ÉVIDENCE  
ET LA SATURATION DES ANTICORPS TUBERCULEUX.

Pour l'étude sérologique, il est nécessaire d'obtenir les antigènes des bacilles tuberculeux non seulement sous une forme cliniquement aussi pure que possible, mais encore sous une forme physique appropriée. En effet, les solutions colloïdales des antigènes qui renferment des particules assez grandes fixent beaucoup mieux l'alexine que les solutions cristalloïdes du même antigène. Celles-ci, par contre, conviennent particulièrement pour les expériences d'inhibition spécifique des anticorps. Nous indiquerons pour chaque antigène les méthodes qui permettent d'obtenir soit des suspensions surtout fixatrices, soit des solutions surtout inhibitrices.

Les *antigènes lipoïdiques* ont été obtenus d'après la méthode de préparation de l'antigène méthylique de A. Boquet et L. Nègre.

Les bacilles tuberculeux stérilisés, lavés et desséchés sont traités pendant vingt-quatre heures par de l'acétone (1 cent. cube d'acétone par centigramme de bacilles), desséchés de nouveau et mis à macérer dans l'alcool méthylique. On les laisse en contact pendant quelques jours à 37°, en agitant fréquemment. Le liquide séparé du dépôt microbien constitue la solution-mère de l'antigène lipoïdique.

Pour l'emploi de cet antigène dans la réaction de fixation de l'alexine, il est recommandé de diluer la solution alcoolique en ajoutant l'eau physiologique goutte à goutte et en agitant continuellement. On obtient ainsi une solution opalescente, constituée par de fines gouttelettes de l'antigène émulsionné dans l'eau.

Ces émulsions possèdent un pouvoir fixateur excellent et elles ne montrent pas le phénomène d'inhibition par excès d'antigène. Si, par contre, on dilue l'antigène lipoïdique en introduisant rapidement la solution alcoolique dans l'eau physiologique, on obtient une solution vraie parfaitement

transparente [H. Sachs et Rondoni (5), H. Sachs et Bock (6)]. Les solutions préparées d'après ce dernier procédé possèdent un pouvoir fixateur plus faible et certaines montrent le phénomène d'inhibition par excès d'antigène. Ceci est, d'après nos expériences, en particulier le cas des antigènes méthyliques préparés avec des bacilles bovins ou humains cultivés en milieu de Besredka ou avec des bacilles bovins lisses, cultivés sur les milieux à base d'œuf-sérum ou de fragments de foie de bœuf ou de cheval recommandés par R. Laporte (7). Les expériences représentées dans le tableau I illustrent ces faits. Cinq antigènes méthyliques dilués, d'une part, goutte à goutte, et, d'autre part, rapidement, ont été examinés, à doses décroissantes, en présence d'un sérum antibacilles bovins (cheval 206) dilué à 1 : 10 et en présence du même sérum dilué à 1 : 50.

La supériorité du pouvoir fixateur des antigènes dilués goutte à goutte se manifeste en présence de sérum très dilué, c'est-à-dire pauvre en anticorps. Les phénomènes d'inhibition apparaissent surtout chez les antigènes dilués rapidement.

Les antigènes *polysaccharidiques* et *protéidiques* ont été isolés d'après une méthode que nous avions étudiée antérieurement avec G. Sandor (8, 9).

Les cultures de bacilles tuberculeux humains ou bovins en liquide synthétique de Sauton, âgées de six à huit semaines, sont filtrées sur papier, puis sur filtre bactériologique (plaqué d'amiant). On dissout 600 grammes de sulfate d'ammonium par litre de filtrat. Un précipité apparaît qu'on sépare par centrifugation. On le redissout dans l'eau, on dialyse la solution dans un sac de collodium, puis on la dessèche dans le vide sulfurique. La substance ainsi obtenue est un mélange de protéides et de polysaccharides.

Pour séparer les protéides et les polysaccharides, on prépare une solution de la substance à 2 p. 100. On lui ajoute 1/5 de son volume d'acide trichloracétique à 40 p. 100. Au bout d'un quart d'heure, on élimine les protéides préciliés par centrifugation ; on les dissout dans de l'eau à la neutralité et on les précipite de nouveau par l'acide trichloracétique. Cette opération est répétée encore une fois, puis le

(5) SACHS (H.) et RONDONI (P.). *Berl. klin. Wochenschr.*, n° 44, 1908.

(6) SACHS (H.) et BOCK (G.). *Arb. a. d. Staatsinst. f. exp. Ther.* Georg Speyer Hause. Frankfurt, 421, 1928, p. 159.

(7) LAPORTE (R.). Ces *Annales*, 57, 1936, p. 400.

(8) SCHAEFER (W.) et SANDOR (G.). Ces *Annales*, 53, 1934, p. 72.

(9) SANDOR (G.) et SCHAEFER (W.). Ces *Annales*, 55, 1935, p. 163.

TABLEAU I.

DILUTION DES ANTIGÈNES 0 c.c. 25	ANTIGÈNES MÉTHYLIQUES						B. bovins et B. humains cultivés sur Sauton	
	B. bovins S cultivés sur foie de bœuf	B. humains cultivés sur milieu de Besredka	B. bovins S cultivés sur milieu de Besredka	B. aviaires cultivés sur Sauton	B. bovins et B. humains cultivés sur Sauton	B. bovins et B. humains cultivés sur Sauton		
	Dilution goutte à goutte	Dilution rapide	Dilution goutte à goutte	Dilution rapide	Dilution goutte à goutte	Dilution rapide	Dilution goutte à goutte	Dilution rapide
<i>0 c.c. 25 de sérum de cheval antibovin S (206) dilué à 1:10 :</i>								
1:20	+	-	-	-	-	-	-	-
1:40	+	-	-	-	-	-	-	-
1:80	++	-	-	-	-	-	-	-
1:160	++	-	-	-	-	-	-	-
1:320	++	-	-	-	-	-	-	-
1:640	++	-	-	-	-	-	-	-
1:1.280	+	-	-	-	-	-	-	-
1:2.560	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>0 c.c. 25 du même sérum dilué à 1:50 :</i>								
1:20	-	-	-	-	-	-	-	-
1:40	-	-	-	-	-	-	-	-
1:80	-	-	-	-	-	-	-	-
1:160	-	-	-	-	-	-	-	-
1:320	-	-	-	-	-	-	-	-
1:640	-	-	-	-	-	-	-	-
1:1.280	-	-	-	-	-	-	-	-

précipité est dissous dans l'eau, dialysé pendant vingt-quatre heures et desséché dans le vide. Il contient les protéides purifiés.

Pour isoler les polysaccharides, on ajoute aux eaux-mères et aux eaux de lavage trichloracétiques réunies, trois fois leur volume d'alcool à 96° et leur volume d'éther anhydre. On centrifuge, on lave le précipité plusieurs fois à l'éther et on le dessèche dans le vide sulfurique.

Les polysaccharides ainsi obtenus sont constitués par un mélange de polysaccharides sérologiquement actifs et de polysaccharides sérologiquement inactifs. La préparation obtenue à partir de la souche humaine fixe l'alexine et flocale en présence d'un sérum antituberculeux jusqu'à la dilution de 1:200.000. Les préparations des polysaccharides bovins sont moins actifs. On peut cependant en isoler une fraction très active en fractionnant les polysaccharides bruts par l'alcool méthylique.

Les polysaccharides précipités par une concentration d'alcool méthylique de 50 p. 100 sont presque inactifs. Les polysaccharides précipités

par une concentration d'alcool méthylique de 50 à 85 p. 100, par contre, sont très actifs. Ils floquent et fixent l'alexine en présence des sérum antituberculeux jusqu'à la dilution de 1 : 500.000 ou de 1 : 1.000.000.

Nous avons étudié, en outre, une préparation de polysaccharides isolés avec E. Chargaff (10) à partir des corps bacillaires dégraissés du BCG en les traitant par l'acide acétique dilué et en précipitant les polysaccharides de la solution par l'alcool à 80 p. 100. Cette préparation floque jusqu'à la dilution de 1 : 500.000. Elle fixe l'alexine d'une manière très fugace à des dilutions entre 1 : 100.000 et 1 : 1.000.000. En solution plus concentrée, elle montre le phénomène d'inhibition par excès.

D'autres préparations polysaccharidiques ont été obtenues par J. J. Perez (11) à partir de tuberculines sur milieu synthétique de souches humaines en éliminant les protéides par précipitation avec 2 volumes d'alcool et en précipitant les polysaccharides par cinq volumes d'alcool. Ces polysaccharides se comportent sensiblement comme le polysaccharide isolé du BCG.

Nous avons décrit ces différentes préparations polysaccharidiques parce que les produits obtenus se distinguent par leur pouvoir fixateur. Les uns fixent l'alexine d'une manière intense et sans montrer le phénomène d'inhibition par excès d'antigène, les autres fixent l'alexine seulement à une certaine dilution et les doses supérieures inhibent la réaction. Ceci semble traduire des différences de la grandeur des particules de ces préparations résultant de l'action plus ou moins désintégrante de la méthode de séparation choisie. L'influence du traitement chimique sur les propriétés sérologiques des polysaccharides ressort de l'expérience suivante :

Une solution à 5 p. 1.000 du polysaccharide d'une souche humaine préparée d'après la première méthode et possédant un pouvoir fixateur intense est partagée en trois portions égales de 2 cent. cubes. L'une est conservée telle quelle. L'autre est légèrement acidifiée par quelques gouttes d'acide acétique dilué, la troisième est alcalinisée avec 1 goutte de soude normale. Les deux dernières solutions sont chauffées

(10) CHARGAFF (E.) et SCHAEFER (W.). *J. Biol. Chem.*, **112**, 1935, p. 393.

(11) Nous remercions notre collègue J. J. Perez d'avoir mis ces préparations à notre disposition.

au bain-marie bouillant pendant une heure. Puis on détermine leur pouvoir flocculant et fixateur d'alexine ainsi que celui de la solution non traitée en présence de sérums antituberculeux (tableau II).

TABLEAU II.

DILUTION de polysaccharide 0 c.c. 25	POLYSACCHARIDE HUMAIN, SOLUTION A 1 P. 1.000		
	non chauffé	chauffé en solution légèrement acide	chauffé en solution alcaline
<i>0 c.c. 25 de sérum de cheval antibovin S (206) dilué à 1 : 20 :</i>			
1 : 2	+	+	—
1 : 4	+	+	—
1 : 8	+	+	—
1 : 16	+	+	—
1 : 32	+	+	—
1 : 64	+	+	—
1 : 128	—	—	—
<i>0 c.c. 25 de sérum de lapin antibovin S (B 100) dilué à 1 : 30 :</i>			
1 : 2	+	+	—
1 : 4	+	+	—
1 : 8	+	+	—
1 : 16	+	+	+
1 : 32	+	+	+
1 : 64	+	+	+
1 : 128	+	+	—
1 : 256	—	—	—

L'expérience montre que le polysaccharide chauffé en solution légèrement acide conserve son pouvoir flocculant et son pouvoir fixateur. Le polysaccharide chauffé en solution alcaline conserve également son pouvoir flocculant. Par contre, son pouvoir fixateur ne se manifeste qu'en solution diluée (sérum B 100); en présence de certains sérums (cheval 206), il paraît même détruit. Pourtant nous montrerons que cet antigène est encore capable de saturer les anticorps polysaccharidiques.

Le mode de préparation des *antigènes protéidiques* a été déjà indiqué. Comme ces antigènes peuvent renfermer des quantités plus ou moins grandes de polysaccharides, il est nécessaire de vérifier si leur pouvoir fixateur est dû aux protéides seuls ou à ces impuretés polysaccharidiques.

A cet effet, nous avons soumis ces préparations à la

digestion trypsique comme l'avait déjà fait K. Meyer (12), et nous avons comparé ensuite le pouvoir fixateur de la préparation non digérée et de la préparation digérée. La préparation digérée fixe uniquement par sa teneur en polysaccharides. Les protéides mêmes ne peuvent être considérés comme antigéniques que si la préparation non digérée fixe l'alexine à des dilutions plus étendues que la préparation digérée.

#### TECHNIQUE DE LA RÉACTION DE SATURATION DES ANTICORPS. SATURATION DES ANTICORPS LIPOÏDIQUES ET POLYSACCHARIDIQUES (13).

Dans ce qui précède, nous avons montré comment on peut isoler les antigènes lipoidiques, polysaccharidiques et protéidiques des bacilles tuberculeux. Nous avons vu que certaines préparations montrent le phénomène d'inhibition par excès d'antigène. De tels antigènes peuvent être utilisés pour la saturation des anticorps correspondants. La technique de la réaction est la suivante :

On détermine d'abord la dose minima inhibitrice des antigènes polysaccharidiques et lipoidiques en présence de l'antisérum sur lequel on veut effectuer l'expérience de saturation. Ce titrage montre, par exemple, que l'antigène polysaccharidique isolé d'une souche humaine et chauffé en solution alcaline fixe l'alexine à des dilutions allant de 1/128 à 1/16 de sa solution à 1 p. 1.000, mais que des doses supérieures ne la fixent plus (tableau II). De même, l'antigène lipoidal, dilué selon le procédé rapide, fixe l'alexine à des dilutions de 1/640 à 1/80, mais non à des concentrations plus fortes (tableau I). Pour l'expérience, on mélange donc :

1<sup>o</sup> 4 cent. cubes de l'antisérum dilué à 1 : 10 avec 4 cent. cubes de l'antigène polysaccharidique mentionné dilué à 1 : 2 ;

2<sup>o</sup> 4 cent. cubes de l'antisérum dilué à 1 : 10 avec 4 cent. cubes de l'antigène lipoidal mentionné, dilué d'après le procédé rapide à 1 : 20 ;

3<sup>o</sup> 4 cent. cubes de l'antisérum dilué à 1 : 10 avec 4 cent. cubes d'eau physiologique (témoin).

Après un temps de contact qui peut être très court puisque l'union de l'antigène et de l'anticorps est immédiate, on ajoute 0 c. c. 25 de ces mélanges à des séries de tubes contenant, sous un volume de 0 c. c. 25, des dilutions de plus en plus grandes, soit des antigènes polysaccharidiques, soit des antigènes lipoidiques, soit des antigènes

(12) MEYER (K.). *Ces Annales*, **59**, 1937, p. 477.

(13) SCHAEFER (W.). *C. R. de la Soc. de Biol.*, **129**, 1938, p. 543.

protéïdiques (non digérés et digérés). Les antigènes servant à révéler les différents anticorps doivent être choisis, de préférence, parmi ceux qui ont un pouvoir fixateur intense. On utilisera donc des antigènes polysaccharidiques obtenus d'après le premier des procédés décrits et des antigènes lipoïdiques dilués goutte à goutte. Ensuite, on ajoute 0 c. c. 25 d'alexine diluée au 1/15 puis, après une heure de séjour à l'étuve, le système hémolytique composé de 0 c. c. 25 de globules rouges à 5 p. 100 et de 0 c. c. 25 d'hémolysine (deux doses minima lysantes).

Les résultats d'une telle expérience sont représentés dans le tableau III.

TABLEAU III.

DILUTION des antigènes 0 c.c. 25	POLYSACCHARIDE humain Solution à 5 p. 1.000 diluée à 1 : 20	ANTIGÈNE méthylique bovin dilué à 1 : 20 goutte à goutte	PROTÉIDE BOVIN Solution à 5 p. 1.000 diluée à 1 : 20	
			non digéré	digéré
<i>0 c.c. 25 de sérum de cheval antibovin S (206) dilué à 1 : 20 :</i>				
1 : 1	+	+	+	+
1 : 2	+	+	+	+
1 : 4	+	+	+	—
1 : 8	+	—	+	—
1 : 16	—	—	+	—
1 : 32	—	—	±	—
1 : 64	—	—	—	—
<i>0 c.c. 25 (4 cent. cubes de sérum 206 dilué à 1 : 10 + 4 cent. cubes de polysaccharide humain alcalinisé et chauffé. Solution à 1 p. 1.000 diluée à 1 : 2) :</i>				
1 : 1	—	+	+	±
1 : 2	—	+	+	—
1 : 4	—	+	+	—
1 : 8	—	+	+	—
1 : 16	—	—	+	—
1 : 32	—	—	—	—
<i>0 c.c. 25 (4 cent. cubes de sérum 206 dilué à 1 : 10 + 2 cent. cubes d'antigène méthylique humain dilué rapidement à 1 : 20) :</i>				
1 : 1	+	—	+	+
1 : 2	+	—	+	+
1 : 4	+	—	+	+
1 : 8	+	—	+	—
1 : 16	+	—	+	—
1 : 32	—	—	—	—

Il s'agit du sérum d'un cheval ayant reçu plusieurs injections intraveineuses de bacilles bovins lisses tués, cultivés sur le milieu à l'oeuf-sérum (cheval 206). Ce sérum réagit avec les antigènes polysaccharidiques, lipoïdiques et protéi-

diques. Après addition d'un excès d'un antigène polysaccharidique humain, il ne réagit plus avec l'antigène polysaccharidique, mais il réagit encore parfaitement avec les antigènes lipoïdiques et protéidiques. Si, d'autre part, on lui ajoute un excès d'antigène lipoïdique (d'une souche humaine), il ne réagit plus avec l'antigène lipoïdique, mais il réagit, comme auparavant, avec les antigènes polysaccharidiques et protéidiques. La saturation des anticorps est donc strictement spécifique.

Deux autres exemples sont représentés dans les tableaux suivants :

Le sérum A 31 (tableau IV) provient d'un lapin qui avait reçu une injection sous-cutanée de 50 milligrammes de bacilles bovins lisses tués, puis desséchés et enrobés dans l'huile de vaseline. Il contient des anticorps lipoïdiques, polysaccharidiques et protéidiques. Le titre des anticorps protéidiques est assez faible. L'antigène protéidique fixe en deux zones. La zone de fixation dans les dilutions étendues est due à la teneur de la préparation en antigène protéidique, la fixation dans les dilutions peu étendues est due à sa teneur en antigène polysaccharidique. Ceci ressort de la comparaison du pouvoir fixateur de la préparation non digérée et de la préparation digérée par la trypsine. Les antigènes employés pour la mise en évidence des anticorps polysaccharidiques sont un polysaccharide bovin purifié ayant un pouvoir fixateur intense et un polysaccharide humain obtenu à partir d'une tuberculine humaine sur milieu synthétique. Celui-ci a un pouvoir fixateur faible. La saturation des anticorps polysaccharidiques a été faite avec ce dernier antigène en excès. Le sérum ainsi traité perd son affinité pour les deux polysaccharides. Les anticorps lipoïdiques sont saturés par l'antigène lipoïdique d'une souche humaine. Le sérum devient de ce fait inactif pour l'antigène lipoïdique d'une souche bovine.

Le sérum D 8 (tableau V) est obtenu par injection sous-cutanée de 400 milligrammes de bacilles humains cultivés sur milieu de Sauton, tués, desséchés et enrobés dans l'huile de vaseline. Il contient des anticorps polysaccharidiques et lipoïdiques. Le tableau montre comment se comporte le sérum en présence des antigènes lipoïdiques d'une souche humaine et

TABLEAU IV.

DILUTION des antigènes	PROTÉIDE BOVIN Solution à 5 p. 1.000 diluée à 1 : 20	POLYSACCHARIDE bovin Solution à 1 p. 1.000 diluée à 1 : 20	POLYSACCHARIDE humain Solution à 1 p. 100 diluée à 1 : 20	ANTIGÈNE méthylique bovin dilué à 1 : 20 goutte à goutte
0 c.c. 25	non digéré	digéré		
<i>0 c.c. 25 de sérum de lapin antibovin S (A51) dilué à 1 : 20 :</i>				
1 : 1	+	+	+	—
1 : 2	+	+	+	+
1 : 4	±	±	+	+
1 : 8	—	—	+	+
1 : 16	—	—	—	—
1 : 32	—	—	—	—
1 : 64	+	—	+	—
1 : 128	±	—	—	—
1 : 256	—	—	—	—
<i>0 c.c. 25 (7 cent. cubes de sérum A51 à 1 : 10 + 7 cent. cubes de polysaccharide humain. Solution à 1 p. 100 diluée à 1 : 20).</i>				
1 : 1	+	+	—	—
1 : 2	+	+	—	+
1 : 4	±	±	—	+
1 : 8	—	—	—	+
1 : 16	—	—	—	—
1 : 32	—	—	—	—
1 : 64	+	—	—	—
1 : 128	±	—	—	—
1 : 256	—	—	—	—
<i>0 c.c. 25 (7 cent. cubes de sérum A51 à 1 : 10 + antigène méthylique humain dilué rapidement à 1 : 50).</i>				
1 : 1	+	+	+	—
1 : 2	+	+	+	—
1 : 4	+	+	+	—
1 : 8	—	—	+	—
1 : 16	—	—	+	—
1 : 32	±	—	+	—
1 : 64	+	—	+	—
1 : 128	+	—	±	—
1 : 256	—	—	—	—

d'une souche bovine et en présence des antigènes polysaccharidiques de bacilles humains et bovins. La saturation des anticorps lipoïdiques a été effectuée avec un antigène lipoïdique bovin. Le sérum ainsi traité ne réagit plus avec les antigènes lipoïdiques, par contre, il réagit, comme auparavant, avec les antigènes polysaccharidiques. La saturation des anticorps polysaccharidiques a l'effet inverse.

TABLEAU V.

DILUTION des antigènes	ANTIGÈNES MÉTHYLIQUES dilués rapidement		POLYSACCHARIDES	
	bovin	humain	bovin	humain
0 c.c. 25				
<i>0 c.c. 25 de sérum de lapin antihumain (D8) dilué à 1 : 30 :</i>				
1 : 4	+	--	+	+
1 : 2	+	--	+	+
1 : 4	+	--	+	+
1 : 8	+	+	+	—
1 : 16	+	+	+	—
1 : 32	—	+	—	—
1 : 64	—	—	—	—
<i>0 c.c. 25 (4 cent. cubes de sérum D8 dilué à 1 : 15 + 4 cent. cubes d'antigène méthylique bovin dilué rapidement à 1 : 10) :</i>				
1 : 4	—	—	+	+
1 : 2	—	—	+	+
1 : 4	—	—	+	—
1 : 8	—	—	+	—
1 : 16	—	—	+	—
1 : 32	—	—	+	—
1 : 64	—	—	—	—
<i>0 c.c. 25 (4 cent. cubes de sérum D8 dilué à 1 : 15 + 4 cent. cubes de polysaccharide humain dilué à 1 : 20) :</i>				
1 : 4	+	--	—	—
1 : 2	+	--	—	—
1 : 4	+	--	—	—
1 : 8	+	+	—	—
1 : 16	+	+	—	—
1 : 32	—	+	—	—
1 : 64	—	—	—	—

Ces expériences montrent que la méthode de l'inhibition spécifique permet non seulement de séparer les différents anticorps d'un sérum, mais encore de préciser si ces anticorps sont strictement spécifiques pour l'espèce de bactilles qui a servi à leur préparation ou s'ils peuvent être saturés par les antigènes correspondants d'autres espèces. Ainsi nos expériences établissent que les anticorps lipoïdiques des sérum antibacilles bovins peuvent être saturés par l'antigène lipoïdique d'une souche humaine et, inversement, les anticorps lipoïdiques des sérum antibacilles humains peuvent être saturés par l'antigène lipoïdique d'une souche bovine. Nous avons même constaté que certains antigènes lipoïdiques de

souches aviaires sont capables de saturer les anticorps lipoïdiques des sérum antibacilles bovins. Les anticorps lipoïdiques des sérum antibacilles humains et bovins ne sont donc pas spécifiques pour le type correspondant. Il en est de même pour les anticorps polysaccharidiques, car nos recherches ont montré (tableaux III et IV) que les antigènes polysaccharidiques des souches humaines saturent les anticorps polysaccharidiques des sérum antibovins.

Dans une dernière série d'expériences, nous avons étudié la saturation sélective des anticorps protéidiques. A cet effet, il fallait disposer un antigène protéidique pur et présentant le phénomène de l'inhibition par excès en présence de l'antisérum. Une préparation de protéides bovins obtenue d'après la méthode de préparation de la *tuberculin phosphotungstique* de A. Boquet et G. Sandor (14) remplissait ces conditions.

TABLEAU VI.

DILUTION DES ANTIGÈNES	PROTÉIDE BOVIN Solution à 5 p. 1.000 diluée à 1 : 20	
	non digéré	digéré
0 c.c. 25		
0 c.c. 25 de sérum de lapin antibovin S (B100) dilué à 1 : 30 :		
1 : 1	+	+
1 : 2	+	+
1 : 4	+	±
1 : 8	+	—
1 : 16	+	—
1 : 32	+	—
1 : 64	+	—
1 : 128	+	—
1 : 256	—	—
0 c.c. 25 (2 c.c. 5 de sérum de lapin [B100] dilué à 1 : 15 + 2 c.c. 5 de tuberculin phosphotungstique diluée à 1 : 10) :		
1 : 1	+	+
1 : 2	+	±
1 : 4	+	—
1 : 8	+	—
1 : 16	—	—

Voici une expérience de saturation des anticorps protéi-

(14) BOQUET (A.) et SANDOR (G.). Ces *Annales*, 57, 1936, p. 622.

diques effectuée avec la tuberculine phosphotungstique (tableau VI). Le sérum de lapin B 100 préparé par injection de bacilles bovins lisses tués et enrobés dans la vaseline, contient des anticorps protéidiques et des anticorps polysaccharidiques. Il réagit, en effet, beaucoup plus fortement avec l'antigène protéidique bovin non digéré qu'avec le même antigène préalablement digéré par la trypsine.

Après addition d'un excès de tuberculine phosphotungstique, ce sérum réagit avec le protéide bovin non digéré presque aussi faiblement qu'avec le protéide digéré. Ceci montre que la plus grande partie des anticorps protéidiques ont été saturés.

Nous avons dû employer une technique un peu différente pour la saturation des anticorps protéidiques du sérum antibacilles bovins du cheval 206. Ce sérum réagit très fortement avec l'antigène protéidique bovin sans qu'il y ait inhibition de la réaction par un excès de cet antigène.

Nous avons cependant réussi à obtenir l'inhibition en employant des dilutions d'antigène chauffées à l'autoclave à 120° pendant quarante-cinq minutes à trois heures (tableau VII). Au cours du chauffage, les protéides perdent leur pouvoir fixateur dans la zone des grandes quantités d'antigène et ils ne fixent l'alexine que dans une zone des dilutions étendues qui se rétrécit de plus en plus.

TABLEAU VII.

DILUTION des antigènes 0 c.c. 25	TUBERCULINE PHOSPHOTUNGSTIQUE Solution à 0,5 p. 1.000				
	non chauffée	chauffée à 120° pendant			2 h. 45
		45 minutes	2 heures		
<i>0 c.c. 25 de sérum de cheval antibovin S (206) dilué à 1 : 20 :</i>					
1 : 4	+	+	+	+	+(1)
1 : 2	+	+	-	-	-
1 : 4	+	+	+	+	-
1 : 8	+	+	+	+	-
1 : 16	+	+	+	+	-
1 : 32	-	-	-	-	-

(1) Les protéides chauffés conservent leur pouvoir fixateur en très forte concentration à cause de la présence d'une petite quantité d'antigène polysaccharidique.

Les protéides ainsi chauffés, ajoutés en quantité inhibitrice au sérum 206 saturent entièrement les anticorps protéidiques ; les anticorps polysaccharidiques ne subissent qu'une légère diminution (probablement à cause des traces d'antigène polysaccharidique contenu dans la tuberculine phosphotungstique), les anticorps lipoïdiques restent entièrement intacts (tableau VIII).

TABLEAU VIII.

DILUTION des antigènes 0 c.c. 25	PROTÉIDE BOVIN		POLYSACCHARIDE bovin Solution à 5 p. 1.000 diluée à 1 : 20	ANTIGÈNE méthylique bovin dilué à 1 : 20 goutte à goutte
	non digéré	digéré		
<i>0 c.c. 25 de sérum de cheval antibovin S (206) dilué à 1 : 20 :</i>				
1 : 1	+	+	±	+
1 : 2	+	+	+	+
1 : 4	+	+	+	+
1 : 8	+	—	+	+
1 : 16	+	—	+	+
1 : 32	+	—	—	±
1 : 64	—	—	—	—
<i>0 c.c. 25 (4 cent. cubes de sérum 206 dilué à 1 : 10 + 4 cent. cubes de tuberculine phosphotungstique chauffée deux heures trois quarts à 120° et diluée à 1 : 10) :</i>				
1 : 1	±	+	—	+
1 : 2	±	+	±	+
1 : 4	—	—	±	+
1 : 8	—	—	±	+
1 : 16	—	—	—	+
1 : 32	—	—	—	—

## RÉSUMÉ.

Les bacilles tuberculeux provoquent dans l'organisme des animaux auxquels ils ont été injectés plusieurs espèces d'anticorps qui réagissent : les uns avec l'antigène lipoïdique des bacilles tuberculeux, les autres avec l'antigène polysaccharidique de ces bacilles. D'autres anticorps trouvés dans certains sérum d'animaux préparés par des bacilles bovins lisses, réagissent avec la fraction protéidique des bacilles bovins. Ces différents anticorps, simultanément présents dans les sérum antituberculeux, peuvent être saturés séparément au moyen de la méthode de l'inhibition spécifique. La technique de cette méthode est décrite en détail.

## **RECHERCHES IMMUNOLOGIQUES SUR LES BACILLES MUQUEUX**

par M. LÉVY-BRUHL et JEANNE COURTOIS.

(*Institut Pasteur.*)

Le groupe des bacilles muqueux a longtemps constitué, du point de vue sérologique, une sorte de *caput mortuum* pour lequel tout essai de classification se montrait infructueux. Ce sont les données immunologiques de l'Ecole américaine (Institut Rockefeller) qui ont fourni les bases d'un classement rationnel fondé sur la répartition en types A, B et C, chacun d'eux se caractérisant par la production d'une substance polysaccharidique bien déterminée ; ces polyosides se comportent comme des *haptènes*, c'est-à-dire que, sans être antigènes, ils réagissent spécifiquement aux sérums expérimentaux qui possèdent ainsi la spécificité de type.

Nous avons recherché en premier lieu si les souches isolées en France trouvaient leur place dans les cadres établis aux Etats-Unis, et avons identifié d'assez nombreux échantillons provenant d'infections humaines et animales. Au cours de cette enquête sérologique il nous a été donné de rencontrer un petit nombre de bacilles manifestant des propriétés polyvalentes, donnée qui ne nous semble pas avoir été encore signalée et qui nous a paru mériter une étude spéciale.

D'autre part, l'application à ces bactéries Gram-négatives des conceptions et des techniques de Boivin nous a permis d'en extraire des complexes glucido-lipidiques qui se sont révélés nettement antigènes.

Ce sont les résultats initiaux de ces recherches immunologiques que nous apportons ici, renvoyant pour certains détails complémentaires à la thèse de J. Courtois (1).

(1) Jeanne COURTOIS. Recherches immunologiques et sérologiques sur les Pneumobacilles. *Thèse Pharmacie*, Paris, 1939.

## CLASSIFICATION SÉROLOGIQUE.

Les premiers essais dus à Sicard (2), Clairmont (3), Bertarelli (4), Porges (5), avaient fourni des données intéressantes mais sans qu'on fût parvenu à réaliser un classement satisfaisant de ces bactéries, les sérum expérimentaux ne possédant qu'un pouvoir agglutinant très faible et de champ très restreint. Ce sont les persévérateurs efforts de Julianelle qui nous ont apporté la classification rationnelle usitée actuellement de façon courante aux Etats-Unis.

Ces recherches, entreprises dès 1922 en collaboration avec Small (6) et basées alors sur l'analyse purement sérologique, avaient abouti à une première ébauche de classification : sur 25 souches étudiées, 10 se classaient dans un groupe qui fut dénommé type A, 8 dans une seconde série dite type B, les autres se présentant comme hétérogènes. Elles furent reprises par la suite à la lumière des notions immuno-chimiques établies par les travaux de l'Institut Rockefeller (Avery, Heidelberger, Goebel) sur la famille des Pneumocoques. Les données aboutissant à la dissociation des antigènes bactériens en fraction protéïnique caractéristique de l'espèce microbienne et fraction glucidique caractéristique du type furent étendues par ces auteurs à d'autres bactéries capsulées et en tout premier lieu aux Pneumobacilles. Cette hypothèse de travail se montra justifiée et féconde, et imprima un nouvel essor à l'étude séro-immunologique. Celle-ci fut reprise par Julianelle en 1926 (7). Les recherches portaient cette fois sur 30 échantillons. Voici quelques précisions sur cet important travail.

**TECHNIQUE.** — Les sérum expérimentaux étaient obtenus par inoculation intraveineuse au lapin, à doses croissantes, de suspensions microbiennes tuées par la chaleur, préparées à partir de cultures jeunes

(2) A. SICARD. *C. R. Soc. Biol.*, **51**, 1899, p. 813-815.

(3) P. CLAIRMONT. *Z. f. Hyg. und Inf. Krank.*, **39**, 1902, p. 1-17.

(4) BERTARELLI. *Rev. d'igiene e san. publ.*, **11**, 1905, p. 48-49.

(5) O. PORGES. *Wiener kl. Woch.*, **18**, 1905, p. 691-694.

(6) SMALL et JULIANELLE. *J. Inf. Diseases*, **32**, 1923, p. 456-473.

(7) L. A. JULIANELLE. *J. Exp. Medicine*, **44**, 1926, p. 113-125.

(cinq à huit heures), injections poursuivies pendant quatre à cinq semaines à raison de 3 par semaine.

Les réactions d'agglutination étaient pratiquées sur des émulsions bactériennes vivantes, mises en présence du sérum à étudier à dilution peu élevée (1/5). Les résultats étaient notés après une incubation de deux heures au bain-marie à 37°, puis un séjour à la glacière pendant la nuit. Pour les épreuves de saturation des agglutinines on utilisait des émulsions microbiennes tuées par la chaleur.

La recherche des précipitines s'effectuait par la mise en contact de 0 c. c. 3 de sérum avec des dilutions croissantes de substance soluble spécifique des divers échantillons.

Pour réaliser l'épreuve de la croissance microbienne en filaments (thread-reaction), on ensemencait en bouillon additionné du sérum spécifique de chacun des types, la dilution du sérum variant de 1/5 à 1/1.000.

Enfin, les épreuves de protection utilisaient des doses de 0 c. c. 2 de sérum injecté à la souris par voie intrapéritonéale. Ces animaux étaient éprouvés avec des cultures jeunes des diverses souches inoculées à des dilutions variables.

**RÉSULTATS.** — Les données fournies par l'épreuve d'agglutination positive, à faible dilution de sérum mais de façon très nette (formation d'amas granuleux avec liquide clair surnageant) ont permis d'identifier trois groupes sérologiquement distincts. Sur 30 souches étudiées, 15 se classaient dans le type A, 6 dans le type B et 3 dans le type C. Les 6 dernières se montrant inagglutinables par tout autre sérum que celui qui avait été préparé avec leurs propres germes pris comme antigènes, sont considérées comme formant le groupe X.

L'épreuve de la saturation des agglutinines vient confirmer le caractère spécifique des anticorps agglutinants qui, fixés sur une des souches d'un groupe, n'exercent plus aucune action sur un autre échantillon de ce même groupe.

D'autre part, suivant une suggestion de Göebel et Avery basée sur l'analogie de composition chimique de la substance hydrocarbonée soluble des souches B avec celle du pneumocoque II, la réaction d'agglutination par le sérum pneumococcique II fut appliquée à ces bacilles et se montra nettement positive alors qu'elle était négative avec les échantillons des autres types. L'épreuve pratiquée sur les souches B avec les sérum pneumococciques I et III se montra également négative.

Les autres tests sérologiques confirmèrent les données de l'agglutination : l'épreuve de la précipitation, pratiquée sur la substance soluble spécifique hydrocarbonée de chaque type, fut également positive à des dilutions de 1/100.000 à 1/500.000.

La culture en filaments, autre aspect du phénomène de flocculation, fournit des résultats étroitement concordants avec ceux de la précipitation et de l'agglutination.

Quant au pouvoir protecteur, il n'avait pu être recherché que vis-à-vis des souches A et B, les échantillons du type C étant dépourvus de virulence expérimentale. Là encore, on trouvait une action nettement spécifique du groupe, la protection apparaissant très marquée vis-à-vis des souches homologues, nulle, par contre, pour les souches hétérologues. Notons également que nous retrouvons l'action croisée du

Pneumobacille type B et du Pneumobacille II qui se montrent excellents antigènes l'un par rapport à l'autre.

En 1930, paraît un nouveau mémoire de Julianelle (8) qui confirme les données précédentes, en particulier la distinction des trois types A, B et C.

Les recherches ont porté cette fois sur 80 échantillons qui se classent ainsi : type A : 42 ; type B : 12 ; type C : 7 ; germes non classables (groupe X) : 19 souches.

Si l'on s'en réfère à l'origine de ces bacilles, on relève que la plupart des germes A ont été isolés au cours d'états infectieux chez l'homme (37 affections pulmonaires, 5 suppurations diverses). Le type B, au contraire, est constitué, pour la plus grande part, des échantillons d'origine animale (cobaye, veau, jument).

Par la suite, les recherches de Julianelle concernent une série de bactéries muqueuses voisines du Pneumobacille. En 1934, en collaboration avec M. C. Moriss (9), il étudie une dizaine de souches de rhinosclérome de provenances diverses et les rattache du point de vue immunologique au Friedländer type C, les tests d'agglutination et de précipitation croisés se montrant nettement et spécifiquement positifs.

Cette donnée se trouve confirmée, en 1936, par les recherches de Castings et Snijders (10) qui ont eu l'occasion d'étudier du point de vue immunologique une cinquantaine de souches de rhinosclérome de provenances géographiques les plus diverses. Tous ces échantillons ont, en effet, fourni des réactions nettement positives, d'une part avec des sérum d'origine rhinoscléromateuse, d'autre part avec le sérum pneumobacillaire C de la classification américaine. Il y a donc là un groupe microbien très homogène, du point de vue de sa constitution immuno-chimique.

Les auteurs hollandais ont étudié en outre un certain nombre de souches de bacilles muqueux d'autre origine : 10 Pneumobacilles dont 6 se révélaient comme du type A, 3 du type B, 1 du type C ; puis des germes isolés dans des cas d'ozène au nombre de 30 dont 24 se classaient dans un premier groupe

(8) L. A. JULIANELLE. *J. Exp. Medicine*, **50**, 1930, p. 539-545.

(9) M. C. MORISS et L. A. JULIANELLE. *J. Inf. Diseases*, **55**, 1934, p. 150-156.

(10) CASTINGS et SNIJDERS. *Z. f. Bakt. Orig.*, **136**, 1936, p. 1-24.

sérologique et 3 dans un second groupe ; ces résultats concordent, à peu de chose près, avec ceux qu'avait obtenus Julianelle (11) [1935], qui sur 19 échantillons de bacilles de l'ozène en trouvait 12 agglutinés par un même sérum et 2 se classant dans un second groupe, les 5 derniers se présentant comme hétérogènes.

Le plus récent travail de Julianelle (12) [1937] est relatif au *Bacterium lactis aerogenes*, mais n'apporte que des résultats d'attente.

En somme, ces recherches sérologiques ont mis en évidence l'existence des trois types A, B et C, le premier rencontré surtout dans les infections observées chez l'homme, le second prédominant en pathologie animale, le troisième comprenant, outre de rares échantillons de pneumobacilles, les souches isolées dans le rhinosclérose.

#### DONNÉES IMMUNO-CHIMIQUES.

Comme dans le cas des Pneumocoques (13), c'est la fraction hydrocarbonée des bacilles muqueux qui caractérise la spécificité du type.

Chacune des trois variétés A, B, C se différencie en effet par la production d'une substance polysaccharidique bien particulière, dont la composition et les propriétés physico-chimiques ont été étudiées et précisées par l'école américaine de l'Institut Rockefeller. Ces corps se présentent comme des hydrocarbones non réducteurs, mais hydrolysables par les acides avec formation de sucres réducteurs. Ce sont des polysaccharides solubles dans l'eau, dialysables à travers les sacs de collodium et filtrables par les bougies, précipitables par l'alcool.

Du point de vue immunologique, ils se comportent non pas comme des antigènes véritables, car ils n'engendrent pas d'anticorps même après injections répétées chez l'animal d'expérience, mais comme des *haptènes* (Landsteiner), c'est-à-dire des réactifs spécifiques, produisant avec ces anticorps des

(11) L. A. JULIANELLE. *J. Bact.*, **30**, 1935, p. 535-543.

(12) L. A. JULIANELLE. *J. Immunology*, **32**, 1937, p. 21-33.

(13) Fort bien exposé par J. POCHON. *Révue d'Immunologie*, **3**, 1937, p. 136-152.

phénomènes de liaisons caractéristiques limitées au groupe (types-spécifiques).

Ces substances s'obtiennent par séparation d'avec la fraction protéinique du microbe, soit par des procédés physiques (filtration à la bougie ou dialyse), soit par des procédés chimiques (précipitation des protéines).

Toeniessen (14), en 1917, avait déjà réussi l'isolement de ces polyholosides du bacille de Friedländer et avait montré leur nature hydrocarbonée. Les corps bactériens, après une précipitation par l'alcool en présence d'acétate de soude, étaient lavés à l'alcool et séchés. On les obtenait ainsi à l'état de poudre.

Avery, Heidelberger et Gœbel réussirent, par diverses méthodes, à obtenir un polyholoside du Pneumobacille à l'état beaucoup plus pur. Les techniques étaient du reste assez complexes : après concentration, on opère des séries de précipitations fractionnées par l'alcool. Les protides sont éliminées par l'acide acétique. De nouvelles purifications sont obtenues, grâce à des précipitations successives par l'alcool, le sulfate d'ammoniaque à saturation, suivies de dialyse et de précipitation par l'acétone.

On a pu ainsi déterminer la composition élémentaire des polyholosides des trois types différents de Pneumobacille et envisager leurs analogies, tout spécialement avec les polyholosides des Pneumocoques.

#### Fraction glucidique du type A.

L'analyse physico-chimique la caractérise ainsi :

POUVOIR ROTATOIRE	— 100°
C . . . . .	43,9 p. 100
H . . . . .	6 —
N . . . . .	0
Cendres . . . . .	0
P . . . . .	0
Equivalent acide . . . . .	430

Sucres réducteurs après hydrolyse 65 p. 100 (en glucose).

(14) TOENIESSEN. *Z. f. Bakt.*, **80**, 1921, p. 225-239.

Ce polyholoside ne réduit la liqueur de Fehling qu'après hydrolyse. L'ensemble de tous ces caractères le rapproche de la fraction glucidique extraite du Pneumocoque III. Ce dernier présente en effet, également, un pouvoir rotatoire lévogyre et un équivalent acide faible. En outre, l'hydrolyse fournit des éléments chimiques analogues.

Malgré les analogies des propriétés de ces deux polysaccharides, on n'a jamais pu mettre en évidence entre eux une parenté immunologique. Plusieurs auteurs supposent qu'il s'agit de deux isomères qui diffèrent seulement par le rang de l'atome de carbone, liant le glucose et l'acide glycuronique.

#### Fraction glucidique du type B.

L'analyse physico-chimique fournit les données suivantes :

POUVOIR ROTATOIRE	+ 100°
C . . . . .	44,6 p. 100
H . . . . .	6,1 —
N . . . . .	0
Cendres . . . . .	0
P . . . . .	0
Equivalent acide. . . . .	680

Sucre réducteur après hydrolyse 70 p. 100 (en glucose).

Ces chiffres se rapprochent beaucoup de ceux fournis par l'étude du polysaccharide extrait du Pneumocoque II.

A cette analogie physico-chimique correspond une parenté immunologique extrêmement étroite, se marquant par l'action croisée *in vitro* comme *in vivo*. C'est ainsi qu'un sérum, préparé en injectant à l'animal l'un des deux microbes, précipite également bien les deux polysaccharides. Il protège la souris contre l'infection par les deux bactéries en cause.

La mise en évidence d'une telle parenté est une des découvertes les plus frappantes de l'immuno-chimie.

#### Fraction glucidique du type C.

Voici les chiffres fournis par l'analyse physico-chimique :

POUVOIR ROTATOIRE	$+ 100^\circ$
C . . . . .	45 p. 100
H . . . . .	5,8 p. 100
N . . . . .	0
Cendres . . . . .	0
P . . . . .	0
Equivalent acide . . . . .	620
Glucose obtenu par hydrolyse . . . . .	75

Si ces éléments hydrocarbonés spécifiques présentent un vif intérêt lorsqu'on les considère isolément, la question de leur liaison, d'une part avec les protéines microbiennes, d'autre part avec les lipides, a suscité également de nombreux et importants travaux.

#### COMPLEXE GLUCIDO-PROTIDIQUE.

Ce premier complexe (protéino-glucidique) a fait l'objet des recherches de l'Institut Rockefeller et a abouti au schéma suivant d'après lequel les sérum expérimentaux se montrent monovalents ou polyvalents selon qu'ils ont été préparés à l'aide des germes capsulés normaux ou des bactéries artificiellement décapsulées. Dans ce dernier cas, en effet, la protéine bactérienne, antigène commun à toute l'espèce, injectée aux animaux d'expérience, fournit un sérum qui réagit sur la protéine des divers microbes, qu'ils appartiennent aux groupes A, B ou C.

Au contraire, les sérum préparés avec les bactéries capsulées contiennent des anticorps qui réagissent spécifiquement sur les polysaccharides, lesquels sont distincts pour chaque type. Il se produit une réaction spécifique du groupe.

#### COMPLEXE GLUCIDO-LIPIDIQUE.

La combinaison glucido-lipidique a fait également l'objet de fort importants travaux, dus à Boivin et à ses collaborateurs.

C'est chez les bactéries « Gram-négatives » qu'on a pu la mettre en évidence, en l'extrayant des corps microbiens, où elle se trouve associée à des protéines, à des sels minéraux et à des substances hydrocarbonées.

Ces données capitales établies par Boivin et ses collaborateurs pour une série de germes du groupe typho-paratyphique (*Salmonella*), puis pour les dysentériques, le *Proteus*, les Colibacilles, ont été étendues à des germes très éloignés de ceux-ci tels que les Méningocoques.

L'application au groupe des Pneumobacilles ne semble pas en avoir encore été réalisée : nous avons eu l'occasion de le mettre en évidence, au cours d'expériences qui se trouvent relatées plus loin.

#### CLASSIFICATION SÉROLOGIQUE DES SOUCHES FRANÇAISES.

Prenant pour point de départ la classification américaine, nous nous sommes proposés, en premier lieu, de rechercher si elle s'appliquait au classement des échantillons isolés en France, en particulier dans les infections humaines à pneumobacilles.

Nous avons pu nous procurer :

D'une part, les souches étalons A, B et C, grâce à l'obligeance du Dr St. John Brook, directeur de la National Collection of type cultures de l'Institut Lister, où elles sont enregistrées sous les numéros 5054, 5055 et 5056.

D'autre part, un certain nombre d'échantillons de bacilles muqueux dus à l'amabilité des professeurs Legroux, Rochaix, Lisbonne, de M<sup>me</sup> le Dr Aitoff, que nous remercions tous ici bien vivement.

Les sérum expérimentaux ont été préparés chez le lapin par injections à doses croissantes par voie intraveineuse de suspensions microbiennes. Celles-ci provenaient de cultures jeunes (sept heures) sur gélose, émulsionnées en eau physiologique, réparties en ampoules et chauffées une heure à 65°, la stérilité de cet antigène étant vérifiée par ensemencement.

Les injections étaient répétées à raison de 3 par semaine, en débutant par des doses assez faibles : 0 c. c. 23 environ. Les animaux présentent toujours au début quelques troubles plus ou moins marqués. On note un amaigrissement assez prononcé, mais dès la deuxième semaine ils supportent facilement l'augmentation de la dose et reprennent leur poids primitif ; on arrive ainsi à injecter jusqu'à 3 cent. cubes

d'émulsion bactérienne lors des dernières inoculations. Celles-ci sont suspendues au bout de cinq ou six semaines. L'animal est laissé au repos pendant une dizaine de jours, puis saigné à blanc à la carotide. Le sérum, décanté, est réparti en ampoules et conservé au frigidaire.

Les sérums étaient ensuite testés pour éprouver le pouvoir agglutinant, son taux et sa spécificité. L'épreuve de l'agglutination pratiquée avec les trois souches étalons A, B et C (émulsion de cultures jeunes sur gélose, non chauffées) nous a toujours montré l'existence d'une spécificité de type, le sérum agglutinant exclusivement l'échantillon du type homologue; quant au taux limite, il variait suivant les animaux d'expérience entre 1/10 et 1/200 ; rappelons que ces antigènes ne produisent que des anticorps agglutinants peu actifs et que les auteurs américains se contentent habituellement du taux de 1/5. Ce qui caractérise avant tout cette agglutination, c'est son caractère *précoce* (au bout de quelques minutes d'agitation) et *massif*, les corps microbiens s'unissant en gros flocons au fond du tube surmontés d'un liquide devenu limpide.

Ces sérums expérimentaux nous ont permis de classer dans les divers groupes A, B et C un certain nombre de souches isolées en France. Dans une première publication (15), nous notions que sur 42 échantillons éprouvés 11 s'étaient révélés du type A, 13 du type B et 6 du type C, 9 souches s'étant montrées inagglutinables et 3 apparaissant comme polyvalentes. Nous reviendrons par la suite sur ce dernier fait qui ne semble pas avoir été signalé jusqu'à présent.

Les identifications ultérieures ont porté à 70 le chiffre des souches étudiées et donné la répartition suivante :

	POURCENTAGE	
Type A . . . . .	21	30
Type B . . . . .	17	24
Type C . . . . .	13	19
Inagglutinables . . . . .	14	20
Polyvalentes . . . . .	5	7

Les résultats des épreuves de *précipitation* ont concordé

(15) M. LÉVY-BRÜHL et Jeanne COURTOIS. *C. R. Soc. Biol.*, **128**, 1939, p. 982-983.

DÉSIGNATION	PROVENANCE	ORIGINE	TYPE
2 . . . . .	Alexandrie.	Infection urinaire.	Polyvalent.
1926 . . . . .	Sumatra.	Rhinosclérome.	C
Bonneval . . . . .	Loir-et-Cher.	Broncho-pneumonie.	A
Guill. . . . .	Paris.	Méningite.	A
Del. . . . .	Paris.	Méningite.	A
Guimb. . . . .	Paris.	Cholécystite.	A
3279. . . . .	Paris.	Pleurésie.	B
99. . . . .	Londres.		C
Denf. . . . .	Paris.		A
S 3 . . . . .	Madagascar.	Cobaye.	B
S 4 . . . . .	Madagascar.	Cobaye.	B
2074 . . . . .	Paris.	Pyélonéphrite.	B
Gran. . . . .	Cayenne.	Granulome inguinal.	A
1842 . . . . .	Paris.	Pyélite.	B
2401 . . . . .	Paris.	Entérite.	B
4140 . . . . .	Londres.		A
Pl. . . . .	Paris.	Pleurésie.	B
418 . . . . .	Londres.	Pneumonie.	A
Lor. . . . .	Lorient.	Septicémie.	C
Rémy. . . . .	Paris.	Pyélonéphrite.	B
2180. . . . .	Paris.	Otite	B
1684. . . . .	Paris.	Pneumonie.	C
Sh. . . . .	Paris.		X
209 . . . . .	Varsovie.	Pyélonéphrite.	C
2041. . . . .	Londres.	Pneumonie.	A
5057. . . . .	Londres.	Pneumonie.	
1244. . . . .	Paris.	Bronchite.	A
G. . . . .	Paris.	Ozène.	A
Lad. . . . .	Paris.	Septicémie.	A
2269. . . . .	Paris.	Otite.	A
P. p. 4 . . . . .	Paris.	Lait.	C
Langl. . . . .	Paris.	Ostéite.	A
2062. . . . .	Paris.	Otite.	X
4458. . . . .	Paris.	Abcès pharyngé.	X
2071. . . . .	Paris.	Cholécystite.	X
A. N. . . . .	Paris.	Septicémie.	X
Chal. . . . .	Paris.	Chalazion.	X
Past. . . . .	Paris.	Cobaye.	B
Brun. . . . .	Paris.	Méningite.	X
Rémy. . . . .	Paris.	Pyélite.	X
Berth. . . . .	Paris.	Mastoïdite.	X
Ver. . . . .	Paris.	Abcès pulmonaire.	X
2904. . . . .	Paris.	Métrite.	Polyvalent.
3024. . . . .	Paris.	Entérite.	Polyvalent.
Sd. . . . .	Paris.	Méningite.	C
Bord. . . . .	Paris.	Otite.	B
St. . . . .	Paris.	Péritonite.	C
Des. . . . .	Lyon.	Septicémie.	A
Duf. . . . .	Lyon.		B
Roch. . . . .	Lyon.		B
Coll. . . . .	Lyon.		B
Cesi. . . . .	Montpellier.		B
Carol. . . . .	Paris.	Cholécystite.	X
Pot. . . . .	Paris.		R
3263. . . . .	Paris.	Amygdalite.	X
3257. . . . .	Paris.	Mastoïdite.	B
Km. . . . .	Berck.	Broncho-pneumonie.	A
3087. . . . .	Paris.	Pneumonie.	X
Car.. . . . .	Paris.	Septicémie.	A
Pf. 3 . . . . .	Paris.	Bronchite.	A

DÉSIGNATION	PROVENANCE	ORIGINE	TYPE
J1 . . . . .	Paris.	Broncho-pneumonie.	C
J2 . . . . .	Paris.	Méningite.	C
Ber. . . . .	Berck.	Pleurésie.	A
Rh. . . . .	Paris.	Rhinité.	C
Vin. . . . .	Paris.	Pyélite.	C
3773. . . . .	Paris.	Métrite.	C
Sct. . . . .	Paris.	Otite.	Polyvalent.
413 . . . . .	Paris.	Cystite.	
Mac. . . . .	Paris.	Lait.	
1214. . . . .	Paris.	Ostéite.	

exactement avec ceux de l'agglutination. Elles étaient pratiquées sur des cultures de trois jours filtrées à la bougie L-3 ou simplement centrifugées à grande vitesse pendant quinze minutes de façon à obtenir un liquide surnageant bien clair.

A 1 cent. cube de ce liquide étaient ajoutés dans une série de tubes 1 cent. cube de chacun des sérum A, B et C, ainsi que du sérum de lapin normal, introduit soigneusement dans le fond du tube de manière à éviter tout mélange. Au bout de quelques minutes, on observe à la zone de contact un anneau très net ; cette technique appliquée par Ascoli, puis par Uhlenhuth aux épreuves de précipitation nous a fourni des résultats très satisfaisants, la réaction se montrant strictement spécifique du type en cause. Le liquide de culture avait été constitué par un milieu synthétique de composition simple tel que le suivant :

Phosphate d'ammonium . . . . .	1
Phosphate bipotassique . . . . .	1
Glucose . . . . .	5
Chlorure de sodium . . . . .	5
Sulfate de magnésium . . . . .	0,20
Eau distillée, Q. S. pour 1 litre.	

amené à pH 7,5 par addition d'un peu de soude, puis stérilisé à 110°.

Les données de cette épreuve confirment celles que nous avaient apportées la réaction d'agglutination : existence de souches polyvalentes, petit nombre des échantillons non classables ; fréquence relative du type B qui se rencontre non seulement dans les infections observées chez l'animal mais

dans un assez grand nombre de cas de suppurations chez l'homme.

Si la réaction de précipitation, de même que celle d'agglutination s'est montrée, dans nos expériences comme dans celles des auteurs américains, étroitement spécifique du *type* en cause, il n'en a pas été de même pour l'épreuve de la *fixation du complément*.

Celle-ci était pratiquée dans les conditions techniques suivantes : les antigènes étaient constitués par des suspensions en eau physiologique de corps microbiens prélevés sur des cultures de sept heures environ sur gélose ; ces émulsions étaient réparties en ampoules et tuées par chauffage une heure à 65° ou dix minutes à 100°.

On procédait, en premier lieu, à la recherche du pouvoir anti-complémentaire de ces antigènes en les éprouvant à doses croissantes avec une quantité fixe de complément puis, après mise en contact quarante-cinq minutes à l'étuve à 37°, on ajoutait le système hémolytique ; nos émulsions microbiennes se sont montrées faiblement anti-complémentaires, la dose de 0 c. c. 4 étant habituellement la première à exercer un effet inhibiteur sur l'hémolyse ; nous avons donc utilisé communément pour l'épreuve sérologique 0,2 et 0,3 d'antigène.

Ces quantités d'antigène étaient mises, pour la réaction proprement dite, en contact avec 0,1 de complément titré et 0,2 des divers sérums A, B, C et lapin normal, une série de tubes témoins servant à contrôler l'absence de pouvoir anti-complémentaire de ces sérums. Après trente minutes d'incubation à l'étuve on ajoutait le système hémolytique (hématies de mouton sensibilisées) ; le résultat était noté après nouveau séjour à l'étuve de trente minutes.

Dans ces conditions, alors que tous les tubes témoins et les tubes « serum normal » présentent une hémolyse totale on constate au contraire l'inhibition complète et, par suite, la fixation du complément positive dans tous ceux où l'antigène microbien se trouve en présence non seulement du serum homologue, mais des autres sérums pneumobacillaires. Il y a donc là non plus réaction spécifique du groupe, mais réaction spécifique de l'espèce bactérienne.

## CARACTÈRES DE LA RÉACTION D'AGGLUTINATION.

I. AGGLUTINATION MACROSCOPIQUE. — Des travaux récents ont mis en lumière les divers aspects que peut revêtir le phénomène si frappant de l'agglutination ; aspects qui sont dus en réalité à l'action des anticorps sur les antigènes divers associés dans la bactérie, celle-ci pouvant être définie suivant l'expression imagée de Maurice Nicolle, une « mosaïque d'antigènes ».

Ces recherches ont porté avant tout sur des germes mobiles, munis de cils, tels le *Proteus*, objet des premières études de Weil et Félix (1915). Elles ont abouti à la distinction des antigènes H et O, notion qui fut étendue par la suite au groupe si important des Salmonellées. Rappelons-en brièvement les caractères principaux :

L'antigène H ou flagellaire est lié à la présence des cils dans l'émulsion microbienne. Du point de vue physico-chimique, il est caractérisé par sa thermolabilité (destruction par chauffage à 70°) ; il est détruit également par certains antiseptiques tels que l'alcool absolu.

L'antigène O ou somatique, par contre, provient des corps microbiens proprement dits et se montre thermostable. Un chauffage à 100° pendant une heure ne l'altère nullement. Il résiste également aux agents chimiques (alcool absolu, acide phénique).

Du point de vue immunologique, l'antigène H détermine la formation d'anticorps H dont l'action se marque par une agglutination caractéristique très nette. Elle est extrêmement rapide, presque immédiate et réalise des flocons très volumineux qui s'amassent au fond du tube mais se laissent dissocier assez facilement.

Au contraire, l'antigène O détermine par injections à l'animal des anticorps O dont l'action se manifeste *in vitro* par une agglutination d'un type tout différent. Elle se produit de façon beaucoup plus lente et les agglutinats ont la forme de grains assez fins, mais se dissociant incomplètement par agitation.

Nous avons été tentés d'interpréter, à la lumière de ces notions aujourd'hui classiques, les faits observés au cours de l'agglutination des Pneumobacilles par les sérum expérimentaux. A première vue, les caractères des agglutinats tendraient à les rapprocher du phénomène agglutinatif H. La rapidité extrême de la production, la grosseur des flocons se classent parmi les faits les plus frappants, et se trouvent d'ailleurs signalés par divers auteurs.

Mais il ne s'agit certainement pas d'antigènes flagellaires comme dans le cas des *Salmonella*, mais d'antigène *capsulaire*.

D'autre part, l'épreuve de la résistance à la chaleur montre une thermostabilité au moins relative. Ainsi, à 70°, le chauffage prolongé pendant plus d'une heure ne modifie pas l'aspect du phénomène. De même, l'ébullition pendant trente minutes laisse intacte la rapidité et l'intensité des formations agglutinatives.

Si l'on prolonge cette ébullition, on voit par contre se modifier sensiblement les caractères de la réaction. Les gros amas se transforment en grains assez fins, réguliers et bien arrondis.

On ne peut donc assimiler ce type d'agglutination aux formes H véritable. Cependant on se trouve en présence d'une réaction agglutinative qui semble nettement distincte du type O auquel il laisse la place par ébullition prolongée.

Nous nous proposons de comparer à l'action de ces sérum expérimentaux celle des sérum que nous préparons actuellement avec des antigènes glucido-lipidiques injectés à une nouvelle série de lapins. Sans doute, obtiendrons-nous une réaction d'agglutination nettement différente.

**II. AGGLUTINATION MICROSCOPIQUE ; GONFLEMENT DE LA CAPSULE.** — On dépose sur une lame I goutte d'émulsion microbienne et I goutte d'un sérum spécifique. Après avoir mélangé intimement les II gouttes on les recouvre d'une lamelle et on examine la préparation au microscope.

Pour faciliter l'observation, nous ajoutons au préalable une trace de colorant. Les meilleurs résultats sont obtenus avec un bleu de Löffler suivant la formule.

Bleu de méthylène à 10 p. 100. . . . .	3 parties.
Solution de potasse non carbonatée à 1 p. 10.000. . .	10 parties.

En présence du sérum spécifique, les bacilles se groupent rapidement, s'agglutinant en amas généralement très volumineux, laissant entre eux des espaces parfaitement clairs.

Les mouvements browniens, très marqués, se trouvent abolis.

Au contraire, un sérum normal ou un sérum hétérologue

laisse le champ tout parsemé de bacilles isolés et répartis de façon très homogène, animés d'oscillations continues.

Si l'on continue l'observation de la préparation, peu à peu les agglutinats présentent un nouvel aspect. *La capsule se gonfle très fortement.*

Déjà, en 1902, Neufeld avait décrit un gonflement de la capsule des Pneumocoques sous l'influence des sérumspécifiques. Cette constatation fut remise en évidence par des tra-

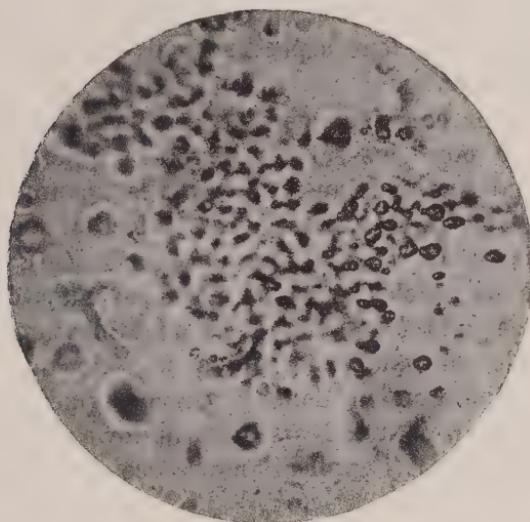


FIG. 1. — Grossissement 2.400.

vaux américains qui montrèrent l'intérêt de ce phénomène.

En France, le professeur Troisier a appelé l'attention sur l'importance scientifique et pratique de cette réaction qui permet d'identifier rapidement un très grand nombre de souches pneumococciques.

Dans le cas des Pneumobacilles, les faits sont extrêmement nets :

Le corps microbien se montre rétracté et paraît entouré d'une zone réfringente très importante, semblant limitée par une membrane.

Si nous suivons l'évolution de la réaction en fonction du temps, le gonflement, précédé par l'agglutination,

atteint son optimum trente minutes environ après le mélange-émulsion-sérum. Cet état de choses persiste pendant une autre demi-heure, mais bientôt la réaction perd peu à peu de son intensité et de sa netteté.

Cependant, si nous la lutons à la paraffine, la préparation se conserve sous son aspect typique.

Nous avons figuré ces phénomènes. Le cliché ci-contre représente la réaction obtenue par le mélange d'émulsion bactérienne de type A avec un sérum A.

Avec la même émulsion A en présence de sérum B, C ou N, les bacilles gardent leur aspect normal et aucune modification n'est à noter.

Ce phénomène peut également être réalisé *in vivo* en faisant agir le sérum non plus sur une émulsion microbienne mais sur un produit pathologique contenant le pneumobacille correspondant, soit qu'il s'agisse d'une infection expérimentale de la souris ou du cobaye (exsudat péritonéal), soit qu'on l'applique à un crachat ou à un pus provenant d'une infection observée chez l'homme. Cette identification rapide du pneumobacille en cause, identique à celle qu'on exécute aujourd'hui couramment dans le cas des pneumococtes, a été de même utilisée aux Etats-Unis [Bullowa, Chest et Friedman (16)] et permet l'application précoce d'une sérothérapie spécifique.

#### ANTIGÈNE GLUCIDO-LIPIDIQUE DES PNEUMOBACILLES.

Rappelons le principe de la préparation de cet antigène ainsi que ses propriétés générales telles qu'elles résultent des travaux de Boivin et ses collaborateurs

On traite les bactéries par l'acide trichloracétique, qui provoque la coagulation des protéines bactériennes et laisse diffuser de nombreuses substances « acido-solubles », sels minéraux, sels ammoniacaux, acides aminés, nucléotides, nucléosides, etc..., tous corps dialysables, et en outre l'antigène complet à grosse molécule, non dialysable.

(16) BULLOWA, CHEST et FRIEDMAN. *Arch. Int. Medicine*, **60**, 1937, p. 735-748.

L'extrait trichloracétique soumis à la dialyse nous donne ainsi une sorte d'émulsion de l'antigène glucido-lipidique.

Nous avons suivi point par point la technique préconisée par Boivin et ses collaborateurs (L. et J. Mesrobeanu), et qui peut se résumer ainsi :

1<sup>o</sup> Les bactéries sont cultivées pendant vingt-quatre heures à 37° sur gélose en boîtes de Roux.

2<sup>o</sup> On les recueille en les émulsionnant avec de l'eau physiologique et la séparation des corps microbiens s'opère grâce à une centrifugation prolongée et à grande vitesse (au moins 6.000 tours pendant une demi-heure).

3<sup>o</sup> La purée bactérienne obtenue est mise en suspension dans de l'eau distillée et diluée, de telle sorte que 1 cent. cube corresponde à 0 gr. 2 de microbes frais.

On ajoute un égal volume d'acide trichloracétique demi-normal et, après agitation, on abandonne pendant deux heures à la glacière.

4<sup>o</sup> Après ce premier temps dans la marche des opérations, on centrifuge à nouveau et l'on obtient ainsi un extrait trichloracétique jaune et opalescent.

5<sup>o</sup> Cet extrait est alors réparti dans des sacs de collodion (collodion acétique à 5 p. 100 coagulé par l'eau), et il reste à dialyser pendant deux jours contre un courant d'eau ordinaire. On élimine ainsi les substances minérales et hydrocarbonées ayant pu diffuser des corps bactériens.

On continue pendant une troisième journée la dialyse contre un grand volume d'eau distillée et on obtient ainsi une émulsion pratiquement neutre, incolore et opalescente du complexe antigénique.

6<sup>o</sup> Il nous suffit de stériliser la solution par filtration sur bougie Chamberland L-3 ; la richesse de cet extrait en complexe antigénique nous est facilement indiquée par évaporation à 100° de 1 cent. cube d'émulsion. Nous pesons l'extrait sec obtenu, ce qui nous fournit 2 milligr. 5 par centimètre cube en moyenne.

Ce complexe présente tous les caractères physico-chimiques décrits par Boivin dans ses travaux sur le bacille d'Aertrycke, puis sur les *Salmonella*, le Colibacille, le B. dysentérique, le *Proteus*, le Vibrion cholérique, le B. pyocyanique, etc..., opa-

lescence, absence de dialyse, réactions des protéines négatives (Tanret, biuret).

#### PROPRIÉTÉS IMMUNOLOGIQUES « IN VITRO ».

Avec ce complexe nous avons pratiqué les expériences vérifiant la spécificité du type et tout particulièrement l'épreuve de la précipito-réaction.

Avant l'emploi, la solution de l'antigène glucido-lipidique dialysée est additionnée de ClNa pour la rendre isotonique (8,5 p. 1.000).

En partant de la suspension glucido-lipidique A, nous reprendons la technique de la réaction d'Uhlenhuth. Si l'on met en contact 0 c. c. 1 de dilution dans un tube de diamètre étroit avec 0 c. c. 1 d'un sérum A, il se produit immédiatement à la limite des deux liquides un anneau très net. Dans le cas des sérum B, C ou normal, la zone de contact reste absolument limpide. En diluant de plus en plus l'antigène nous arrivons encore à percevoir un anneau jusqu'au 1/10.000.

#### EPREUVE DE LA FIXATION DU COMPLÉMENT.

En partant de la solution glucido-lipidique A, nous pratiquons l'épreuve de la fixation du complément en présence des sérum A, B, C et lapin normal.

Le titrage de l'antigène s'opère en ajoutant à des doses croissantes d'antigène une quantité fixe de complément, lui-même titré au préalable.

Nous employons des doses de solution glucido-lipidique de 0,05, 0,08, 0,10, 0,12, 0,15, 0,18, 0,2 (1 cent. cube correspondant à 2 milligr. 5 d'antigène sec).

Après avoir complété à 0 c. c. 25 avec de l'eau physiologique on continue comme dans un titrage ordinaire (0 c. c. 1 de complément titré et 0 c. c. 5 du système hémolytique).

Dans aucun tube nous n'avons constaté d'arrêt de l'hémolyse du système globules rouges de mouton sensibilisés. L'antigène ne présente donc pas de pouvoir anti-complémentaire. On opère alors la réaction suivant la technique employée précédemment avec une émulsion bactérienne.

Pour la réaction proprement dite, nous employons deux doses croissantes du complexe glucido-lipidique : 0 c. c. 1 et 0 c. c. 2 et nous les mettons respectivement en présence d'une dose fixe de chacun des sérum A, B, C et N et d'une quantité également fixe de complément titré.

Les tubes 3, 6, 9, 12 ne contiennent pas d'antigène et sont les témoins sérum.

Les tubes 13 et 14 sont les témoins antigènes et le tube 15 le témoin du système hémolytique.

Après un séjour d'une heure à l'étuve à 37°, il suffit d'ajouter partout 0 c. c. 3 de globules de mouton dilués au 1/20 et sensibilisés au préalable.

Nous obtenons un résultat absolument superposable à celui de la réaction de fixation dans le cas de l'émulsion bactérienne. Il y a réaction positive de chaque antigène non seulement avec le sérum correspondant, mais avec les trois sérum A, B et C à l'exclusion du sérum normal. Comme nous avons vérifié l'absence de protéines dans le complexe glucido-lipidique par les réactions de Tanret et du biuret négatives, nous pouvons éliminer l'hypothèse d'un antigène protéinique présent dans la solution. D'autre part, nous avons vu précédemment que l'élément glucidique ne réagit qu'avec le sérum homologue ; il se montre spécifique du type.

Par conséquent, dans cette épreuve de fixation du complément, le seul élément auquel nous pouvons attribuer un rôle polyvalent n'est autre que le *lipide* qui dans ce cas se montre spécifique de l'espèce.

On sait en effet qu'actuellement la conception antigénique des lipoïdes est admise par les auteurs. C'est précisément dans les réactions de fixation du complément que ces substances jouent un rôle important (Sachs).

#### TOXICITÉ DE L'ANTIGÈNE GLUCIDO-LIPIDIQUE.

Nous avons éprouvé la toxicité de l'antigène glucido-lipidique chez la Souris, par voie intraperitoneale et sous-cutanée.

Par voie péritonéale, la dose de 0 c. c. 2 d'une émulsion de l'antigène correspondant à 1 milligramme de substance sèche amène la mort en trois heures. L'animal présente

quelques secousses, puis tombe dans un état de profonde somnolence.

La voie sous-cutanée se montre également efficace, mais la période de survie atteint deux à trois jours pendant lesquels l'animal se montre nettement abattu ; le poil est hérisse, les yeux clos. Nous n'avons pas noté de diarrhée.

L'ébullition, prolongée pendant huit minutes, n'affaiblit pas sensiblement ce pouvoir toxique puisque les souris injectées avec l'antigène ainsi traité succombent dans les mêmes délais que les précédentes. Ceci confirme les données apportées par Boivin et ses collaborateurs sur la thermostabilité de la toxine glucido-lipidique en milieu neutre. Il nous reste à réaliser la dissociation des deux éléments par chauffage en milieu acide.

#### ETUDE D'UNE SOUCHE POLYVALENTE.

Dans notre première publication nous avions signalé l'existence d'un petit nombre d'échantillons sensibles à la fois à l'action des sérum A, B et C, à l'exclusion des sérum normaux. Actuellement, sur 70 souches étudiées, 5 ont manifesté cette polyvalence, soit 7/100. On pourrait nous objecter qu'il s'agit en réalité de cultures mixtes où des germes du type A, d'autres du type B, d'autres du type C se trouvent associés. Sans pouvoir éliminer cette hypothèse d'une façon absolue, nous croyons cependant pouvoir l'écartier, ayant pris soin de travailler sur des cultures provenant de *colonies isolées* sur boîte de gélose. L'isolement à partir d'une plastide unique au moyen du micro-manipulateur aurait donné plus de garanties encore mais n'a pu être réalisé.

La réaction d'agglutination avait mis en évidence cette polyvalence que l'épreuve de précipitation est venue confirmer. Nous avons choisi une de ces souches (n° 2, provenant d'un cas d'infection urinaire chez l'homme) pour approfondir l'étude de cette particularité. Nous en avons extrait le complexe glucido-lipidique suivant la technique rappelée plus haut et l'avons soumis à diverses épreuves sérologiques. La réaction de précipitation a donné avec chacun des sérum A, B et C un anneau très net se produisant encore avec une dilu-

tion du sérum à 1/1.000, alors que plusieurs sérums de lapins normaux restaient sans action. Ces anneaux présentent la même intensité pour chacun des trois sérums spécifiques. Il ne s'agit donc pas de co-précipitines mais d'une véritable précipito-réaction polyvalente.

Nous avons d'ailleurs procédé à la saturation fractionnée des trois antigènes glucido-lipidiques A, B et C, contenus dans la suspension provenant de la souche « 2 ».

A cet effet on réalise une première précipitation du complexe glucido-lipidique en le mettant au contact du sérum A. Il se forme un anneau abondant. On s'assure que le liquide surnageant ne donne plus de précipitation avec une nouvelle quantité de sérum A. On recommence ensuite la même épreuve sur ce liquide avec du sérum B. Nous amenons ainsi la formation d'un deuxième anneau aussi abondant que le précédent. Après s'être assuré que le liquide surnageant ne donne plus de précipitation avec une nouvelle dose du sérum B, on effectue la troisième épreuve avec du sérum C.

On obtient de cette façon un autre anneau de même abondance que dans les deux cas précédents.

Nous avons donc ainsi réalisé une saturation fractionnée des trois antigènes contenus dans notre complexe glucido-lipidique.

D'autre part, avant d'entreprendre ces épreuves de saturation, nous nous étions assurés, par les réactions du biuret et de Tanret, que la solution glucido-lipidique ne contenait pas de protéines. Il ne peut donc être question de substances protéiques communes présentes dans le liquide mais bien d'un complexe glucido-lipidique répondant aux trois types.

*In vivo* le complexe glucido-lipidique de la souche « 2 » manifeste également sa polyvalence dans sa fonction antigénique. En effet l'injection au lapin de doses répétées et croissantes de cet antigène glucido-lipidique nous a procuré un sérum dont la polyvalence a été éprouvée par la réaction de précipitation, ce sérum fournissant un anneau très net et abondant avec les trois cultures filtrées de A, B et C.

Il y a donc bien production d'anticorps vis-à-vis des trois antigènes.

L'existence de souches polyvalentes ne paraît pas avoir été

signalée en ce qui concerne le Pneumobacille. On sait qu'au cours des identifications des types de Pneumocoque on rencontre des échantillons se présentant comme I + II, I + III, etc. Mais ces faits ne semblent pas avoir fait l'objet de recherches systématiques. Nous nous proposons de poursuivre l'étude de ces phénomènes, en particulier d'établir les courbes de production des trois substances hydrocarbonées spécifiques en fonction du temps et de noter les variations observées en modifiant la composition du milieu de culture (milieu synthétique).

#### RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Nous avons, en premier lieu, soumis à l'analyse sérologique un assez grand nombre de souches de bacilles muqueux isolées en France au cours d'états infectieux divers, les sérum expérimentaux étant préparés chez le lapin par injection intra-veineuse d'émulsions microbiennes des trois types A, B et C de la classification américaine. Sur 70 échantillons ainsi éprouvés, 56 se sont montrés sensibles à l'action de ces sérum, 21 se révélant du type A, 17 du type B, 13 du type C, 5 se présentant comme polyvalents ; 14 bacilles étaient inagglutinables. Si l'on compare cette répartition à celle qu'ont observée les auteurs américains, on relève une fréquence sensiblement plus grande en France du type B où ne se classent guère, aux Etats-Unis, que les souches d'origine animale alors que chez nous il se rencontre dans les cas d'infection humaine presque aussi souvent que le type A. Notons également que l'existence des souches polyvalentes ne paraît pas avoir été signalée par les auteurs américains. Si les réactions d'agglutination et de précipitation se montrent étroitement concordantes et spécifiques du *type*, il n'en est pas de même de la fixation du complément qui apparaît comme caractéristique de l'*espèce* microbienne, liée sans doute à un antigène commun vraisemblablement de nature lipidique.

L'agglutination peut être effectuée soit suivant le procédé macroscopique, soit suivant une technique microscopique. Dans le premier cas les phénomènes observés, par le caractère précoce et massif de la formation des flocons, rappellent l'agglutination de type H des bactéries ciliées ; cependant

l'antigène capsulaire qui intervient ici présente une thermostabilité relative que ne possède pas l'antigène flagellaire des bacilles mobiles, résistant à un chauffage à 70° prolongé pendant une heure. L'agglutination microscopique s'accompagne d'un *gonflement de la capsule* extrêmement marqué sous l'influence du sérum spécifique, phénomène qui peut être utilisé pour le diagnostic rapide du type en cause dans un produit pathologique (pus, crachat).

Appliquant les techniques de Boivin, nous avons extrait de ces bactéries un complexe glucido-lipidique qui s'est montré *in vivo*, comme pour les Salmonellées, doué d'un pouvoir毒ique et d'un pouvoir antigène. Eprouvés *in vitro* vis-à-vis des sérum A, B et C, ces complexes ont fourni à la précipitation une réaction spécifique du type et à la fixation du complément une réaction caractéristique de l'espèce. Les mêmes expériences réalisées sur une des souches qui s'étaient montrées polyvalentes nous ont permis d'en extraire un complexe glucido-lipidique dont la polyvalence a pu être démontrée *in vitro* par la précipitation avec les trois sérum (permettant la saturation fractionnée des trois antigènes A, B et C); de même *in vivo*, l'injection au lapin a déterminé la production d'un sérum doué de propriétés nettement polyvalentes.

**CULTURE BACTÉRIOLOGIQUEMENT PURE  
ET NUTRITION AUTOTROPHIQUE  
D'EUDORINA ELEGANS EHREBG. (VOLVOCIDÉE).  
ROLE DU FER POUR LA FORMATION DES COLONIES**

par HISATAKE DUSI.

(Institut Pasteur, Service de Physiologie microbienne.)

Max Hartmann [1] a réalisé la culture indéfinie d'*Eudorina elegans*, sous sa forme asexuée ; mais il s'agissait de cultures bactériologiquement impures. Schreiber [3] a montré qu'il est possible de se débarrasser des bactéries et des petits flagellés qui s'attachent souvent à la gelée des colonies d'*Eudorina elegans* et réalisé pour la première fois la culture bactériologiquement pure de cette espèce à partir de cultures sur un milieu solide. Ce procédé n'a pas permis à Mainx [4] d'éliminer les bactéries. Pringsheim signale qu'il a obtenu la culture pure d'*Eudorina elegans* (« Collection of type cultures of Algae and Protozoa », Londres, 1939). Nous avons également obtenu la culture bactériologiquement pure du même flagellé par lavage d'une colonie.

La souche a été isolée en septembre 1933 d'une auge d'un jardin de Condé-sur-Ifs (Calvados). La purification bactériologique a été effectuée par lavage dans le milieu suivant : peptone pancréatique de viande (5 C de Vaillant) 4 grammes, eau distillée 1.000, NaOH q. s. pour pH 7.0. Une colonie de 32 individus, pêchée à la pipette sous la loupe binoculaire, a été transportée successivement dans 9 bains de ce milieu stérile, puis dans un tube contenant 8 cent. cubes du même milieu peptoné. Cette colonie s'est désagrégée et l'examen du tube a été négatif pendant un mois. Au cours du deuxième mois, quelques colonies de 4 et de 8 individus ont fait leur apparition et la culture s'est enrichie graduellement. Les

épreuves usuelles et l'examen direct ont démontré la pureté bactériologique de la souche.

De nombreux milieux d'entretien étudiés, à base d'asparagine, de soie hydrolysée, d'extrait d'humus, d'extrait de viande, de peptone de viande, nous avions retenu au début de nos essais comme donnant les résultats les meilleurs le milieu préconisé ci-dessus à la peptone de viande (pH 7,0). Les tubes sont placés derrière une fenêtre exposée au Nord.

Dans ces conditions, *Eudorina elegans* se développe toujours, la vitesse de croissance des cultures dépendant toutefois de l'intensité lumineuse et de la température. D'après notre expérience, l'influence de la lumière sur la culture est très grande. *Euglena viridis* mise à part, aucun flagellé à chlorophylle n'est aussi sensible à son influence qu'*Eudorina elegans*. Si l'intensité n'est pas suffisante, le développement de la culture s'arrête. Dès que la lumière devient suffisamment intense, la multiplication reprend. En utilisant ce phénomène, on peut entretenir très longtemps une souche sans repiquage.

L'ensemencement des tubes (9 cent. cubes de milieu) étant pratiqué avec III gouttes de la culture souche (= une dizaine de colonies), le nombre de colonies parfaites, à 32 individus, est faible dans les premiers jours. Le développement optimum est atteint de la troisième semaine au deuxième mois, suivant les conditions physiques (lumière, température). Dans les cultures anciennes, les colonies deviennent moins compactes et on peut alors observer des colonies irrégulières et pauvres en flagellés et qui finissent par se détruire. Dans les très vieux tubes, il n'y a plus que des flagellés isolés.

Lunz [5] n'a jamais observé la réapparition des colonies parfaites dans des cultures impures, en milieu de Benecke. Nous ne l'avons pas non plus constatée dans des cultures pures anciennes en milieu organique.

Cependant, au cours de nos essais, le comportement de notre souche a subi un changement notable. De septembre 1935 (date de l'isolement) à septembre 1936, le développement en milieu peptoné a été régulier et normal (formation de colonies parfaites) ; de septembre 1936 à février 1937, le développement a été irrégulier et, entre février 1937 et octobre 1939, nous n'avons plus observé de colonies parfaites dans les

milieux peptonés, même additionnés de citrate de fer. Notons que toutes nos expériences ont été effectuées dans des milieux liquides.

On pouvait se demander si *Eudorina elegans* est capable de se multiplier dans des milieux minéraux. Les résultats positifs obtenus par Hartmann [1, 2] dans les milieux de Knop et de Benecke ne sont, à cet égard, pas démonstratifs, puisque les cultures étaient impures. Schreiber [3] avait constaté qu'un milieu de Knop modifié est excellent pour la culture impure d'*Eudorina elegans*, mais il n'a pas fait de recherches avec des cultures pures. Lunz [5] remarque également que le milieu de Benecke donne de bons résultats pour la culture de cette espèce.

Nous avons utilisé le milieu suivant : sulfate de magnésium, 0 gr. 1 ; phosphate monopotassique, 0 gr. 2 ; chlorure de potassium, 0 gr. 1 ; solution de Berthelot, 1 cent. cube ; eau bidistillée, 1.000, auquel nous avons ajouté l'un des sels suivants à la concentration M/100 : sulfate d'ammonium, phosphate d'ammonium, nitrate de potassium, nitrate de calcium. Les milieux étaient ajustés à pH 7,0. Les résultats ont été entièrement négatifs. Mais si l'on diminue la concentration de l'aliment azoté, on obtient des cultures excellentes. Dans ces conditions, les limites favorables des concentrations en ions H et OH correspondent à des pH compris entre 6,0 et 7,0. A pH 5,5 les cultures sont possibles, mais pauvres. Les cultures sont assez bonnes en présence de nitrate de calcium de concentration M/500, excellentes à M/1.000, assez bonnes à M/2.000, faibles à M/4.000. A la concentration de M/100 il n'y a pas de développement du tout. Pas de développement non plus avec du sulfate d'ammonium, du phosphate d'ammonium et du nitrate d'ammonium M/100, M/500 et M/1.000 à pH 6,8. Nous avons ainsi pu faire, en cinquante-quatre mois, 25 repiquages dans un milieu minéral au nitrate de calcium. Si la lumière est suffisante, on peut y conserver très longtemps la souche sans repiquages. Ainsi, un tube ensemencé le 14 décembre 1937 renferme encore des flagellés vivants le 2 janvier 1940.

Si l'on supprime la solution de Berthelot, on obtient au premier repiquage une culture constituée uniquement par

des flagellés isolés. Le deuxième repiquage est négatif. L'addition au milieu de sels de fer, à la place de la solution de Berthelot, permet des cultures normales avec formation de colonies. Il est donc nécessaire d'ajouter du fer aux milieux pour obtenir la culture d'*Eudorina elegans*. Le fer a été ajouté sous forme de sulfate ferrique ou de chlorure ferrique, dont les solutions étaient stérilisées à part et introduites aseptiquement dans le milieu. Dans ces conditions, il n'y a pas de précipitation. La concentration optima en fer pour la formation de colonies est comprise, pour le sulfate ferrique,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ , entre  $1,25 \times 10^{-4}$  M et  $1,875 \times 10^{-4}$  M environ, et pour le perchlorure de fer (cristallisé pour analyse, Merck),  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , entre  $1,875 \times 10^{-4}$  M et  $3,75 \times 10^{-3}$  M environ.

La nécessité du fer pour le développement d'autres Volvocidées : *Volvox minor* et *globator*, a déjà été constatée par Uspenski et Uspenskaja [6]. Pour *Eudorina*, le premier symptôme de la carence en fer n'est pas l'arrêt de la multiplication, mais l'absence de formation de colonies.

#### CONCLUSIONS.

1° Nous avons pu réaliser la culture bactériologiquement pure en milieu liquide d'*Eudorina elegans*.

2° L'isolement a été fait en milieu peptoné. Dans ce milieu, la souche a pu être entretenue pendant un an et demi. Puis les cultures ne s'y sont plus produites d'une manière normale : absence de colonies parfaites.

3° Une culture régulière et normale est possible, dans un milieu minéral à base de nitrate de calcium et contenant du fer.

4° La suppression du fer entraîne d'abord l'arrêt de la formation des colonies, puis l'arrêt de la multiplication.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] HARTMANN (M.). *Arch. f. Protistenk.*, **43**, 1921, p. 223.
- [2] HARTMANN (M.). *Arch. f. Protistenk.*, **49**, 1924, p. 375.
- [3] SCHREIBER (E.). *Zeitschr. f. Bot.*, **17**, 1925, p. 337.
- [4] MAINX (F.). *Zeitschr. f. Bot.*, **68**, 1929, p. 105.
- [5] LUNZ (A.). *Arch. f. Protistenk.*, **86**, 1935, p. 90.
- [6] USPENSKI (E. E.) et USPENSKAJA (W. J.). *Zeitschr. f. Bot.*, **17**, 1925, p. 273.

## **SUR LA GLYCÉMIE DU COBAYE ET DU LAPIN SOUS L'INFLUENCE DU VENIN DE COBRA (1)**

par GABRIEL BERTRAND et RADU VLADESCO.

L'action produite chez les animaux supérieurs et chez l'homme par l'inoculation des venins de serpents est très complexe ; elle résulte, en effet, de ce que ces sécrétions renferment de multiples substances; parmi elles, on en a déjà distingué qui provoquent l'altération des globules rouges, la coagulation ou l'hydrolyse de certains protéides, la saponification partielle de la lécithine, la mise en liberté de l'acide phosphorique inclus dans les composés nucléiques, etc. Amenées au contact du sang et des tissus, ces substances provoquent, directement ou indirectement, des séries de symptômes, variables à la fois selon leur origine et selon les espèces animales auxquelles elles sont inoculées.

Au cours d'expériences entreprises en vue d'obtenir des éclaircissements sur le mécanisme intime de l'intoxication par le venin du Cobra (*Naja tripudians* Merrem), nous avons reconnu un symptôme qui n'avait pas encore été signalé : c'est une augmentation importante de la teneur du sang en glucose.

Nos expériences ont été effectuées sur deux espèces animales, le cobaye et le lapin, très voisines au point de vue zoologique, mais dont le comportement avec le venin étudié est néanmoins, à certains égards, bien différent.

Tout d'abord, les deux rongeurs en question n'ont pas la même sensibilité générale au venin : le cobaye est moins résistant que le lapin. Par exemple, alors qu'une dose de 4 milligr. 23 d'un échantillon de venin a déterminé la mort de 1.000 grammes de lapin en une heure et demie, il en a suffi de 1 milligr. 33 pour tuer 1.000 grammes de cobaye en une demi-heure.

(1) Un extrait de ce mémoire a été publié dans les *C. R. Ac. Sc.*, 209, 1939, p. 585. A la page 587, ligne 15, il faut lire : sérum au lieu de : venin.

Ensuite, il y a une différence remarquable entre les deux espèces animales quant aux symptômes consécutifs à l'inoculation : ces symptômes sont plus variés et plus manifestes chez le cobaye que chez le lapin.

A la suite, en effet, de l'injection sous-cutanée d'une dose léthale de venin de cobra dissoute dans l'eau salée physiologique, on peut noter chez le cobaye de l'agitation, de petits cris, de la salivation, des efforts de vomissements, des hoquets, du hérissement des poils, des mictions répétées, enfin de la paralysie débutant par le train postérieur, atteignant la respiration, puis le cœur, et un refroidissement sensible de la surface du corps avant la mort (2).

Chez le lapin, on n'observe pour ainsi dire aucun de ces phénomènes, seulement quelques contractions cloniques peu avant la fin. Le corps du lapin, à l'inverse de celui du cobaye, ne se refroidit pas sensiblement avant la mort, il reste même encore chaud à la main notablement après.

Malgré ces différences, le cobaye et le lapin ont présenté la même modification, soit une forte hyperglycémie, à la suite de l'injection du venin sous la peau de l'abdomen.

Pour apprécier cette modification, le sang a été prélevé, avant et après l'injection, directement dans le cœur par piqûre du ventricule et le dosage du sucre a été fait aussitôt, sur 1 cent. cube, selon la technique de Baudoin et Lewin (3).

Voici les résultats que nous avons obtenus (tableau I) :

Les chiffres qui mesurent cette hyperglycémie varient beaucoup suivant les expériences. Ils dépendent non seulement des espèces et des individus de la même espèce sur lesquels on opère, mais aussi des doses de venin injectées et du moment où le sang est prélevé. Nous n'avons pas cru devoir entreprendre de toutes ces variations une étude systématique qui aurait coûté beaucoup d'animaux, mais nous avons effectué déjà assez d'expériences pour reconnaître que le phénomène augmente d'intensité avec le temps jusqu'à la mort de

(2) Le refroidissement prémortel est toutefois beaucoup moins marqué que dans l'intoxication vipérique. De tels symptômes ont été décrits autrefois par l'un de nous (Gab. Bertrand) en collaboration avec C. Phisalix. (Voir notamment *C. R. Soc. de Biol.*, 2<sup>e</sup> série, 3, 1896, p. 858.)

(3) *Bull. Soc. Chim. biol.*, 9, 1927, p. 280.

TABLEAU I.

ANIMAUX EXAMINÉS	POIDS DE L'ANIMAL en grammes	VENIN SEC INJECTÉ en milligrammes	TEMPS ÉCOULÉ en heures		GLUCOSE par litre de sang en gramme		AUGMENTATION de la glycémie p. 100
			au moment de la nouvelle prise de sang	au moment de la mort	avant l'injection	après l'injection	
Cobaye 1 .	570	1,4	1	3	0,909	1,034	13,7
Cobaye 2 .	630	1,5	1,30	1,35	0,944	1,115	18,1
Cobaye 3 .	525	1,4	1,45	1,45	0,934	1,610	72,4
Cobaye 4 .	805	1,1	1	1,05	0,904	1,664	84,0
Lapin 5 . .	2.835	12,0	1,30	1,35	1,451	1,560	7,5
Lapin 6 . .	3.005	6,0	1	1,35	1,134	1,417	24,9

l'animal, du moins lorsque la dose est assez forte pour amener celle-ci en quelques heures. Voici les résultats de plusieurs expériences dans lesquelles deux prises de sang ont été effectuées après l'inoculation, dont la seconde dans le cas des n°s 8, 9 et 10, au moment même où l'animal allait visiblement succomber. L'hyperglycémie a atteint alors le point le plus élevé, comme le montrent les chiffres du tableau II.

Le venin de Cobra qui a servi dans les expériences rapportées ci-dessus nous avait été procuré par l'Institut Pasteur de

TABLEAU II.

ANIMAUX EXAMINÉS	POIDS DE L'ANIMAL en grammes	VENIN SEC INJECTÉ en milligramme	TEMPS ÉCOULÉ en heures		GLUCOSE par litre de sang en gramme		AUGMENTATION de la glycémie p. 100
			au moment de la nouvelle prise de sang	au moment de la mort	avant l'injection	après l'injection	
Cobaye 7 .	710	0,25	0,35		0,998	1,164	16,6
Cobaye 8 .	530	0,7	2,07	4,30	—	1,496	49,9
Cobaye 9 .	545	0,6	—	3	1,114	1,304	47,0
Lapin 10 .	2.980	1,0	—	2,40	0,984	1,316	33,7
— . .	—	—	1	2,40	—	1,646	66,7
— . .	—	—	5	5	0,686	0,859	28,2
— . .	—	—	—	—	—	0,931	33,7

Saïgon. Il provenait de serpents capturés à Preyveng (Cambodge) et avait été récolté le 11 septembre 1935 avec les précautions requises. Mais nous disposons d'autres échantillons. Parmi eux s'en trouve un, originaire de Chandernagor, récolté en septembre 1934, dans des conditions que nous ne connaissons pas, et presque dépourvu de toxicité. Essayé au point de vue de l'action sur la glycémie, il a donné comme résultats (tableau III) :

TABLEAU III.

ANIMAUX examinés	POIDS de l'animal en grammes	VENIN injecté en milligrammes	TEMPS ÉCOULÉ au moment des nouvelles prises de sang en heures	GLUCOSE par litre de sang en gramme		GLYCÉMIE p. 100
				avant l'injection	après l'injection	
Cobaye 11.	562	5,5	1	1,131	1,048	- 7,3
Cobaye 12.	550	5,4	1	0,978	0,733	- 25,0
Lapin 13 .	2.770	24	1	1,330	1,460	+ 9,8
— .	—	—	3	—	1,700	+ 27,8
Lapin 14 .	3.550	21	1	0,997	1,164	+ 16,7
— .	—	—	6	—	1,343	+ 34,7

Aucun des animaux n'est mort et n'a même présenté de signe manifeste d'envenimation.

Comme on voit, le produit qualifié de venin provenant de Chandernagor n'a pas agi de la même manière sur le cobaye et sur le lapin. Il y a eu une diminution de la glycémie chez le premier, de l'hyperglycémie seulement chez le second.

S'agissait-il vraiment d'un venin de cobra, à la rigueur d'un venin récolté dans de mauvaises conditions, ayant, par exemple, subi un commencement d'altération pour avoir été trop lentement ou incomplètement desséché ? Cela est peu probable. Non pas seulement parce que ce produit est sans action nucléolytique — celle-ci aurait pu disparaître en même temps que l'action toxique — mais surtout parce qu'il ne renferme que très peu de zinc : 0 gr. 193 par kilogramme au lieu de 6 gr. 57 trouvés dans l'échantillon authentique de venin de cobra utilisé ci-dessus. Cette faible teneur en métal, très éloignée de celle du venin, est de l'ordre de grandeur de celle présentée par divers liquides d'origine animale, tels par exemple que le sérum sanguin.

Nous avons eu l'idée d'essayer, à titre comparatif, l'action du sérum normal de cheval sur le cobaye et sur le lapin. Ce sérum a été pesé à l'état sec, finement pulvérisé et mis en contact avec dix fois son poids d'eau. Après environ deux heures de contact et redissolution aussi avancée que possible, sans filtrer, il a été injecté sous la peau. Les résultats ont été les suivants (tableau IV) :

TABLEAU IV.

ANIMAUX examinés	POIDS de l'animal en grammes	VENIN injecté en milligrammes	TEMPS ÉCOULÉ au moment de la prise de sang en heures	GLUCOSE par litre de sang en gramme		GLYCÉMIE p. 100
				avant l'injection	après l'injection	
Cobaye 15.	480	4,2	1	1,014	0,648	- 36
Lapin 16	2.840	26	1	0,972	1,001	+ 3
—	—	—	3	—	1,001	+ 3

A l'intensité près des phénomènes, le sérum de cheval s'est comporté non comme le venin de cobra, mais comme la substance de Chandernagor : au lieu de provoquer une hyperglycémie marquée chez le cobaye et chez le lapin, il a abaissé la teneur en glucose du sang chez le premier de ces animaux. Vis-à-vis du lapin, il présente aussi une différence : son action hyperglycémante a été, sinon douteuse, du moins beaucoup moins forte que celle du venin de cobra et du produit de Chandernagor.

En conséquence de cet ensemble de faits, nous nous croyons autorisés à conclure à l'existence dans le venin de *Cobra capello* ou Serpent à lunettes d'une substance, non encore signalée, produisant chez le cobaye et chez le lapin une hyperglycémie progressive et particulièrement marquée au moment de la mort.

L'étude de ce phénomène, qui présente le caractère avantageux au point de vue expérimental d'être facilement mesurable, permettra sans doute de mieux comprendre le processus complexe de l'envenimation ophidienne, voire de combattre celle-ci avec de plus grandes chances de succès.

**RECHERCHES SUR LA RÉPARTITION  
ET LA LOCALISATION DES CAROTÉNOÏDES,  
DES FLAVINES  
ET DE L'ACIDE-L-ASCORBIQUE  
CHEZ LES MOLLUSQUES LAMELLIBRANCHES  
CAS DES HUITRES ET DES GRYPHÉES VERTES ET BLANCHES**

par GEORGES BROOKS et ROBERT PAULAIS.

(Institut Pasteur, Service de chimie biologique.)

La détermination de la teneur en caroténoïdes, en flavines et en acide-l-ascorbique chez certains mollusques lamellibranches Marennes (*Ostrea edulis*), Portugaises (*Gryphaea angulata*), a montré que ces corps sont répartis d'une manière inégale dans les différents organes. Cette répartition est semblable à celle de certains infinitésimement petits chimiques minéraux. L'accumulation des caroténoïdes, des flavines et de l'acide-l-ascorbique a surtout lieu dans la masse viscérale [1].

INTRODUCTION.

La répartition et la localisation des caroténoïdes, des flavines et de l'acide-l-ascorbique chez les mollusques n'ont pas fait l'objet, jusqu'à présent, de recherches approfondies. Les renseignements que l'on possède sont peu nombreux et souvent on trouve des chiffres disparates ou seulement certaines indications de présence ou d'absence, rarement quantitatives, excepté pour quelques rares travaux basés sur des tests biologiques, tel celui de M<sup>me</sup> Randoïn [2]. Les recherches dont nous donnons aujourd'hui les résultats ont porté sur plusieurs échantillons d'huîtres et de gryphées, vertes et blanches, qui nous ont été envoyées grâce à l'obligeance de M. Chaux-Thevenin, inspecteur du contrôle sanitaire de l'Office des

Pêches (1). Ces échantillons provenaient de lots de même origine et les diverses phases de leur élevage sont connues. Les huîtres dites Marennes (*Ostrea edulis*) sont originaires de Locmariaquer en Bretagne et élevées à La Trémbblade, et les gryphées dénommées Portugaises (*Gryphaea angulata*) provenaient de naissain recueilli au Château d'Oléron.

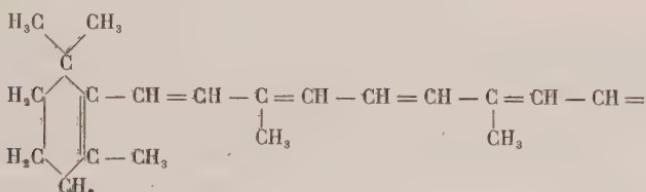
#### APERÇU GÉNÉRAL DE LA MÉTHODE.

Pour le dosage des caroténoïdes et des flavines nous avons employé la méthode déjà indiquée par l'un de nous [3] avec quelques modifications techniques nouvelles telles que : adsorption ultra- et microchromatographique sur  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , manipulation à l'abri de la lumière et de l'air, coefficient de partage des solvants. Voici les détails de la technique adoptée. Les pigments sont extraits par  $\text{H}-\text{CH}_2\text{OH}$  à 50 p. 100 ; on isole les caroténoïdes par agitation de la solution hydro-alcoolique avec le benzène. Cette agitation provoque la formation fréquente d'émulsion, que l'on peut éviter en imprimant à l'am-poule à décantation un léger mouvement hélicoïdal.

La solution benzénique lavée à l'eau et concentrée renferme surtout des caroténoïdes épiphasiques [4]. Cette solution est saponifiée à froid dans le vide avec de la potasse alcoolique à 10 p. 100. L'insaponifiable séparé est adsorbé sur colonne d'oxyde d'aluminium de Brockmann standardisé et le développement du chromatogramme est effectué avec un mélange de benzène et d'éther de pétrole en proportions diverses 4 : 2 ; 3 : 2 additionné de 1 à 2 p. 100 d'alcool. Les zones de coloration que l'on observe sur la partie supérieure de la colonne d'adsorbant sont assez variées (elles sont orangées et rougeâtres diffus pour les *Portugaises* et teintées de violet pour les *Marennes*). On peut en général, d'une façon qualitative, distinguer sur la partie colorée certains groupes de caroténoïdes, connaissant déjà les relations entre leur pouvoir adsorbant et leur constitution chimique. Citons par exemple le nombre de doubles liaisons aliphatiques ou conjuguées, les groupe-

(1) Nous adressons ici nos sincères remerciements à M. Chaux-Thevenin qui a bien voulu nous faire parvenir divers échantillons d'origine exactement déterminée.

ments  $-OCH_3$ , etc... Mais le peu de substance isolée ne nous a pas permis d'étudier séparément ces différents groupes de caroténoïdes ; néanmoins, nous sommes arrivés à mettre en évidence, d'une façon générale, l'existence des hydrocarbures carotènes par leurs spectres d'absorption en solution benzénique (deux bandes à 484-484 m $\mu$ , spectrographe Féry plaque microlumière). Ce qui nous intéresse particulièrement, ce sont les pigments renfermant certaines provitamines A. On se rappelle que le groupement actif caractéristique de ces provitamines est le suivant [16] :



On utilise parfois l'ultramicrochromatographie lorsque des échantillons moins riches en pigment donnent des zones à peine colorées et difficilement séparables.

Quant à l'isolement des flavines, on concentre dans le vide à l'obscurité les phases méthyliques et les eaux de lavages réunies à un volume réduit d'environ 5 à 10 cent. cubes, en ayant soin de maintenir le pH aux environs de 7. On évite, pour ainsi dire, une partie de la transformation de la flavine en ses dérivés (lumichrome ou lumiflavine) de fluorescence bleue et qui gênent bien souvent le dosage. On s'assure que les extraits flaviniques de chaque échantillon possèdent bien leurs caractères physicochimiques et spectrographiques connus (extinction de la fluorescence jaune verdâtre par addition d'hydrosulfite de sodium et réapparition par agitation en présence d'oxygène ou d'air [formation réversible du leucodérivé], spectre de fluorescence s'étalant vers les grandes longueurs d'onde ayant pour maximum d'intensité à  $\lambda$  562 à 563 m $\mu$ ).

*Coupes histologiques.* — Ces flavines existent en petite quantité à l'état libre, mais se trouvent en grande partie sous forme de flavoprotéides décelables sur des coupes histologiques immergées dans H-CH<sub>2</sub>OH à 50 p. 100 et portées à l'étuve à 37°, ou traitées par CH<sub>3</sub>COOH [5] et examinées au micro-

fluoroscope de Reichert. On peut s'en rendre compte aussi par dialyse à froid en présence d'acide ou encore par ultrafiltration.

Le dosage de l'acide-l-ascorbique s'effectue selon la micro-méthode de Harris et Ray [6], en employant le 2-6 dichlorophénol-indophénol. Pour son extraction, on a employé un mélange de  $\text{PO}_3\text{H}$  à 2 p. 100 et  $\text{CH}_3\text{COOH}$  à 5 p. 100 ajusté à pH 2,5, l'acide métaphosphorique inhibe les oxydases [7, 13].

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE.

*Préparation des échantillons.* — A chaque arrivée au laboratoire les huîtres sont mises dans une glacière réglée à + 4° où elles séjournent quarante-huit heures durant les différentes extractions et dosages. Après dissection soigneusement faite, les organes sont lavés en les plongeant successivement dans 5 cristallisoirs contenant de l'eau bidistillée. On répartit en deux lots : d'une part les branchies et le manteau et d'autre part la masse viscérale.

#### *Extractions des caroténoïdes et des flavines.*

**CAROTÉNOÏDES.** — 15 à 20 grammes d'organes sont broyés avec du sable de quartz jusqu'à obtention d'une purée que l'on transvase dans un flacon coloré bouché à l'émeri. On ajoute quatre fois son poids de méthanol à 50 p. 100 que l'on soumet pendant vingt-quatre heures à une agitation modérée à l'aide d'un moulin hydraulique, en maintenant à une température de 40°. Ensuite, on centrifuge et on décante l'extrait méthylique. Le résidu est repris par la moitié d'alcool au même titre et le traitement se fait comme précédemment. On traite de nouveau par le méthanol à 90 p. 100 [8]. En général trois extractions suffisent pour séparer ces pigments. Ces extraits sont réunis et dilués avec de l'eau pour avoir de l'alcool à 50 p. 100. On tient compte naturellement de la teneur en eau de chaque échantillon. Les caroténoïdes sont isolés par quatre agitations successives avec du benzène. La solution benzénique décantée est lavée avec de l'eau pour débarrasser des traces d'alcool et concentrée sous vide poussé,

vers 40°, dans un appareil rodé à l'émeri et laqué en noir. Lorsqu'on obtient un volume réduit d'environ 30 cent. cubes on procède à la saponification dans le vide à froid avec de la potasse alcoolique à 10 p. 100. Après six heures de contact, l'opération est terminée ; on ajoute alors un peu d'alcool éthylique et on extrait l'insaponifiable par le benzène. La solution benzénique de caroténoïdes est lavée soigneusement à l'eau distillée et séchée sur le sulfate anhydre de sodium. Cette solution est filtrée sur une colonne d'oxyde d'aluminium de Brockmann standardisé, long de 13 à 20 centimètres et de 0 millim. 8 de diamètre. Il se forme, en général, une zone jaune orangé teintée parfois de lilas ou de rouge provenant très probablement de carotènes oxydés ( $\beta$  carotinone, oxycarotène) ou d'autres pigments voisins. On développe cette zone, on la coupe et on fait l'élution avec un mélange de benzène additionné de 1 p. 100 d'alcool éthylique. On fait le dosage sur une partie aliquote à l'aide d'une solution de carotène benzénique fraîchement préparée [3] et sur le reste on détermine le spectre d'absorption.

**FLAVINES.** — Les solutions méthyliques débarrassées des caroténoïdes et des dérivés de la flavine sont concentrées comme précédemment jusqu'à 10 cent. cubes environ. Le liquide obtenu présente une fluorescence jaune verdâtre, dont on détermine les propriétés physicochimiques et spectrographiques [9], comparativement avec celles de la riboflavine de synthèse. On effectue en outre le dosage [3]. Si la quantité de flavine est très petite on l'adsorbe sur  $\text{Al}_2\text{O}_3$  préalablement activé avec de l'eau selon les indications de Ruggli et Jensen [10]. L'élution se fait avantageusement en employant un mélange pyridine-méthanol et eau 1 : 1 : 2.

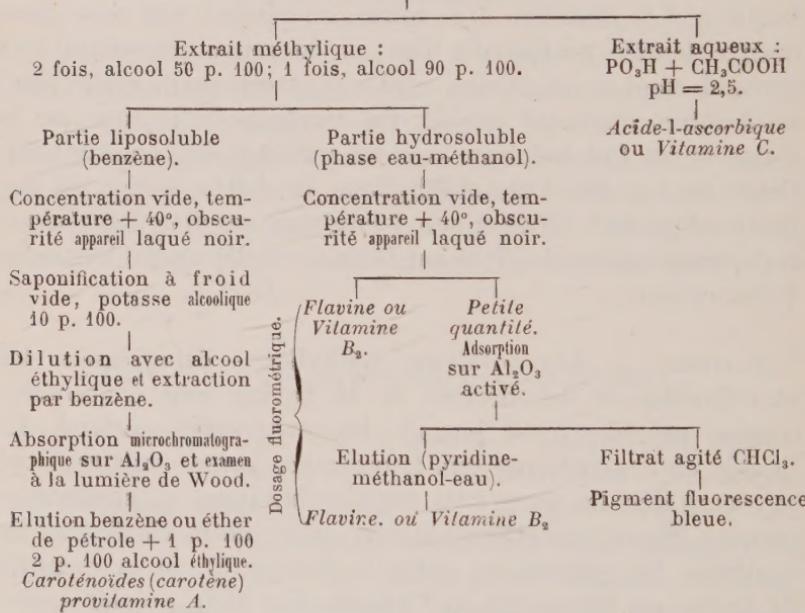
#### *Extraction et dosage de l'acide-l-ascorbique.*

Les organes sont broyés avec du sable de quartz en présence d'un mélange de  $\text{PO}_3\text{H}$  et  $\text{CH}_3\text{COOH}$  ajusté à pH 2,5. On filtre ensuite, sur un creuset d'Iéna IG I garni auparavant d'une couche de sable pour éviter le colmatage et on termine par un lavage avec le même mélange d'acides. Le filtrat bien

homogénéisé est dosé avec une solution de 2-6 dichlorophénol-indophénol. Ce colorant est en solution millième normale (268 milligrammes par litre). On se sert d'une microburette de Malmy. Le titrage est arrêté lorsque la teinte rose persiste trente secondes. Le titre de la solution de ce colorant est établi à l'aide d'une solution au millième normale de vitamine C (soit 88 milligrammes).

*Schéma de différentes opérations.*

*Huitres.*  
*Branchies et Manteau ou Masse viscérale.*



Les tableaux qui suivent expriment la teneur en caroténoïdes, en flavines et en acide-l-ascorbique des huîtres vertes et blanches en  $\gamma$  par gramme de tissus frais.

#### CONCLUSIONS.

On voit d'après les chiffres ci-dessus que les caroténoïdes, les flavines et l'acide-l-ascorbique sont inégalement répartis dans les différents organes ; lorsque l'on compare les variétés vertes et blanches, les variations sont sensiblement parallèles

VARIÉTÉ D'HUÎTRES	TAILLE moyenne		ORGANES	Y PAR GRAMME de matière fraîche.		
	Longueur en centimètres	Largueur en centimètres		Caroténoïdes	Flavine	Acide-L-ascorbique
<i>Gryphaea angulata</i> Lam., mises en claires en automne 1937. Origine, Château d'Oléron :						
1. Portugaise verte . . . .	8,35	5,40	Branchies, manteau . . . .	0,60	2,00	18,40
1 bis. Portugaise blanche . .	8,25	5,50	Masse viscérale . . . .	7,50	4,10	31,20
2. Portugaise verte . . . .	8,60	6,00	Branchies, manteau . . . .	0,70	1,00	11,30
2 bis. Portugaise blanche . .	8,50	4,95	Masse viscérale . . . .	11,80	2,40	44,50
3. Portugaise verte . . . .	9,45	5,40	Branchies, manteau . . . .	1,60	2,00	12,80
3 bis. Portugaise blanche . .	9,55	5,45	Masse viscérale . . . .	9,70	2,60	15,60
			Branchies, manteau . . . .	0,80	1,20	13,20
			Masse viscérale . . . .	16,00	4,50	19,80
			Branchies, manteau . . . .	0,40	0,80	10,50
			Masse viscérale . . . .	20,00	4,40	14,60
			Branchies, manteau . . . .	1,00	0,50	10,40
			Masse viscérale . . . .	22,00	4,60	22,50
<i>Ostrea Edulis</i> Lin., mises en claires en septembre 1937. Origine, Locmariaquer . .						
1. Marenne verte . . . . .	7,10	7,00	Branchies, manteau . . . . .	0,30	3,00	32,00
1 bis. Marenne blanche . . .	7,10	6,95	Masse viscérale . . . . .	3,10	3,80	64,50
2. Marenne verte . . . . .	6,90	7,00	Branchies, manteau . . . . .	0,60	2,00	30,00
2 bis. Marenne blanche . . .	7,00	7,00	Masse viscérale . . . . .	1,80	3,40	82,00
3. Marenne verte . . . . .	7,00	6,85	Branchies, manteau . . . . .	0,70	4,40	21,50
3 bis. Marenne blanche . . .	7,30	6,90	Masse viscérale . . . . .	1,20	3,50	44,00
			Branchies, manteau . . . . .	0,20	3,80	20,00
			Masse viscérale . . . . .	0,60	4,20	33,80
			Branchies, manteau . . . . .	0,30	1,20	10,60
			Masse viscérale . . . . .	1,60	2,80	34,20
			Branchies, manteau . . . . .	2,80	0,90	16,80
			Masse viscérale . . . . .	7,50	1,30	42,70

dans les espèces et, dans leurs variétés vertes et blanches, existent en quantités de grandeurs comparables à celles de certains infinitiment petits chimiques minéraux [11, 12, 14]. Ces résultats nous amènent à rappeler qu'on a pu démontrer pour certaines de ces substances dosées une synergie d'action avec les oligoéléments [15] qui jouent certainement un rôle important dans la physiologie cellulaire des mollusques.

De l'ensemble de ces résultats on constate que les caroténoïdes, les flavines et l'acide-L-ascorbique ont une répartition

différente suivant les organes et sont surtout accumulés dans la masse viscérale (2).

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BROOKS (G.) et PAULAIIS (R.). *C. R. Acad. Sc.*, **208**, 1939, p. 883.
- [2] RANDOIN (L.). *C. R. Acad. Sc.*, **177**, 1923, p. 498 ; *Vues actuelles sur le problème de l'alimentation*, Paris, 1937.
- [3] BROOKS (G.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **20**, 1938, p. 498.
- [4] LEDERER (E.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **20**, 1938, p. 554.
- [5] FONTAINE (M.) et BUSNEL (R.). *Bull. Inst. Océanogr.*, n° 742, 1938.
- [6] BIRCH, HARRIS et RAY. *Biochem. J.*, **27**, 1933, p. 590.
- [7] MUSULIN (R.) et KING. *Journ. of Biol. Chem.*, **116**, 1936, p. 406.
- [8] FABRE (R.) et LEDERER (E.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **16**, 1934, p. 114.
- [9] BROOKS (G.). *C. R. Acad. Sc.*, **205**, 1937, p. 1465 ; *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **20**, I, 1938, p. 498.
- [10] RUGGLI (P.) et JENSEN (P.). *Helvet. Chim. Acta*, **18**, 1935, p. 624.
- [11] BERTRAND (G.) et VLADESCO (R.). *Bull. Soc. Chim.*, **33**, 4<sup>e</sup> série, 1923, p. 341.
- [12] PAULAIIS (R.). *C. R. Acad. Sc.*, **203**, 1936, p. 685 ; **204**, 1937, p. 1508 ; *Thèse Doctorat Sc.*, Paris, 1939.
- [13] MEUNIER (P.). *Annales des Fermentations*, **3**, 1937, p. 157.
- [14] M<sup>me</sup> BRANDT-BAUZEMONT. *Thèse Doctorat Sc.*, Paris, 1931. — WANG-TAI-SI. *Thèse Doctorat Sc.*, Paris, 1928.
- [15] BERTRAND (G.). Rapport au VI<sup>e</sup> Conseil de Chimie Solvay, Bruxelles, 1937 ; VI<sup>e</sup> Congrès de Chim. Biol., Lyon, 1937 ; *Arch. Inst. Prophylact.*, **10**, 1938, p. 55.
- [16] JAVILLIER (M.). *Bull. Sc. ph.*, **43**, 1936, p. 337.

(2) En raison des événements actuels nous n'avons pu poursuivre l'étude physiologique de ces diverses extractions et particulièrement leur isolement à l'état pur.

---

*Le Gérant : G. MASSON.*